

Aus der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Marianne Wigger (k)

**Proliferation und Apoptose bei der autosomal-rezessiven
polyzystischen Nierenerkrankung: eine immunhistochemische
Untersuchung an Nieren und Lebern**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Annica Rätz

Bielefeld, April 2013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

Gutachter: 1. Gutachter
Prof. Dr. med. Dieter Haffner
Direktor der Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

2. Gutachter
Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler
Direktor des Institutes für Pathologie, Universitätsklinik Rostock

3. Gutachter
Prof. Dr. med. Jun Oh
Stellvertretender ärztlicher Direktor der Klinik für Pädiatrische Nephrologie, Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

Vorgelegt am: 30.04.2013

Verteidigt am: 05.11.2013

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abkürzungsverzeichnis	
III	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
1.	Einleitung	1
1.1	Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)	1
1.1.1	Übersicht	1
1.1.2	Krankheitsverlauf und Diagnostik der ARPKD	1
1.1.3	Makroskopische und mikroskopische Eigenschaften der Nieren und Lebern von ARPKD-Patienten	3
1.1.4	Fibrocystin (FPC) und die Zilien-Hypothese	3
1.2	Zellproliferation	4
1.2.1	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)	6
1.2.2	Akt - ein Protein zwischen Proliferation und Apoptose	6
1.2.3	mTOR - das zentrale Protein des PI3K-Signalweges	7
1.2.4	pS6K - ein bedeutendes Zielprotein von mTOR und Schlüsselregulator der Proteintranslation	8
1.3	Die Apoptose	9
1.3.1	Die Caspasen – die wichtigsten Proteasen der Apoptose	9
1.3.2	Der extrinsische Signalweg	11
1.3.3	Der intrinsische Signalweg	12
1.3.4	Bcl-2: ein Modulator des intrinsischen Signalweges	12
1.3.5	Überschneidungen des extrinsischen und intrinsischen Signalweges	13
2.	Ziel der Arbeit	14
3.	Material und Methoden	15
3.1	Präparate und Reagenzien	15
3.1.1	Präparate	15
3.1.2	Reagenzien für morphologische und immunhistochemische Untersuchungen	15
3.1.2.1	Chemikalien und Antikörper	15
3.1.2.2	Zusammensetzungen selbst hergestellter Puffer und Waschlösungen	17
3.1.2.3	Laborgeräte und Programme	17
3.2	Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen	17
3.2.1	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	17
3.2.2	Immunhistochemische Färbungen mit der Avidin-Biotin-Complex-Technik (ABC-Methode)	18

3.2.3	Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode und Streptavidin- POD-Färbung	19
3.3	Bildanalyse und Auswertung	20
3.3.1	Semiquantitative Auswertung	20
3.3.2	Computergestützte Bildanalyse zur Bestimmung der relativen Parenchym- fläche in den Präparaten der Zystennieren	21
4.	Ergebnisse	22
4.1	Charakterisierung des Patientenkollektives	22
4.2	Histomorphologische Charakterisierung der erkrankten Nieren und Lebern	23
4.3	Immunhistochemische Analyse von Nieren und Lebern	26
4.3.1	Expression des Proliferationsmarkers Ki-67	26
4.3.2	Analyse der Akt-mTOR-Signalkaskade: Nachweis von pAkt, pmTOR und pS6K	28
4.3.3	Nachweis von Markern der Apoptose und des antiapoptotischen Faktors Bcl-2	33
4.3.3.1	Nachweis von Caspase-8 als Marker des extrinsischen Signalweges	33
4.3.3.2	Nachweis von Annexin V als Marker der frühen Apoptose	34
4.3.3.3	Nachweis von Caspase-3 und fragmentierter DNA als Marker der fortge- schrittenen Apoptose	36
4.3.3.4	Aktivität des antiapoptotischen Faktors Bcl-2	38
4.3.3.5	Zusammenfassende Beurteilung der Apoptosemarker	40
5.	Diskussion	44
5.1	Charakterisierung des Patientenkollektives	44
5.2	Histomorphologische Charakterisierung der erkrankten Nieren und Lebern	45
5.3	Immunhistochemische Analyse von Nieren und Lebern	45
5.4	Ausblick	50
6.	Zusammenfassung	52
7.	Thesen	54
8.	Literaturverzeichnis	56
IV	Anhang	

II **Abkürzungsverzeichnis**

ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (autosomal dominant polycystic kidney disease)
Apaf-1	Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1 (apoptotic protease activating factor 1)
ARPKD	autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (autosomal recessive polycystic kidney disease)
BH	Bcl-2-Homologie
CAD	Caspase aktivierte DNase (caspase-activated DNase)
CDK	Cyclin-abhängigen Kinase (cyclin depended kinase)
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex (death-inducing signaling complex)
DFF	DNA fragmentierender Faktor (DNA fragmentation faktor)
4EBP1	eukaryotischer Initiationfaktor 4E bindendes Protein (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1)
EGF	epidermal growth factor
ER	endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne (Fas-associated death domain)
FPC	Fibrocystin/Polyductin
FYVE	Phe-Tyr-Val-Glu
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
KHF	kongenitale hepatische Fibrose
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MOMP	mitochondriale äußere Membranpermeabilisierung (mitochondrial outer membrane permeabilization)
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR-Komplex
PC-1	Polycystin 1
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B / Akt
PKHD1	polycystic kidney and hepatic disease 1
PS	Phosphatidylserin
pS6K	p70 ribosomales Protein S6 Kinase
ROI	regions of interest
SSW	Schwangerschaftswoche
TSC	Tuberöse Sklerose Komplex
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor

III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Der PI3K-Signalweg (modifiziert nach (Atkins, MB et al. 2009))	5
Abb. 2	Zielproteine von Akt (modifiziert nach (Vanhaesebroeck, B and Waterfield, MD 1999))	7
Abb. 3	mTOR-Komplex 1-(mTORC1) und mTORC2 mit ihren Funktionen im Zellzyklus (modifiziert nach (Zaytseva, YY et al. 2012))	8
Abb. 4	Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose (modifiziert nach (Vogelstein, B and Kinzler, KW 2004))	10
Abb. 5	Überschneidungen des intrinsischen und extrinsischen Signalweges (modifiziert nach (Degterev, A et al. 2003))	13
Abb. 6	Repräsentative Gewebeschnitte der Nieren nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
Abb. 7	Repräsentative Gewebeschnitte der Lebern nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
Abb. 8	Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67	27
Abb. 9	Immunhistochemischer Nachweis von pAkt	28
Abb. 10	Immunhistochemischer Nachweis von pmTOR	29
Abb. 11	Immunhistochemischer Nachweis von pS6K	30
Abb. 12	Gegenüberstellung von pAkt, pmTOR, pS6K und Ki-67 in Niere und Leber eines Patienten	32
Abb. 13	Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-8	33
Abb. 14	Die auf die Gewebefläche bezogene Parenchymfläche in Relation zum Annexin V-Score in Nieren von ARPKD Patienten	34
Abb. 15	Immunhistochemischer Nachweis von Annexin V	35
Abb. 16	Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3	36
Abb. 17	Immunhistochemischer Nachweis von fragmentierter DNA	37
Abb. 18	Die auf die Gewebefläche bezogene Parenchymfläche in Relation zum Bcl-2-Score	38
Abb. 19	Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-2	39
Abb. 20	Beziehung zwischen der Zystengröße und den Apoptosemarkern	41
Abb. 21	Gegenüberstellung von Annexin V, aktivierter Caspase-3, aktivierter Caspase-8, Bcl-2 und fragmentierter DNA an Niere und Leber eines Patienten	43
Tab. 1	In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper	16
Tab. 2	Anthropometrische Charakteristika des Patientenkollektives (n = 16)	22
Tab. 3	Die auf die Gewebefläche bezogene relative Parenchymfläche	24

Tab. 4	Übersicht über die Anzahl der Präparate und Patienten, die für die Untersuchung der Apoptosemarker zur Verfügung standen	26
Tab. 5	Individuelle Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchungen zur Aktivierung der Akt-mTOR-Signalkaskade und der Expression von Ki-67	31
Tab. 6	Individuelle Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchung (Score) der Nieren von ARPKD-Patienten zum extrinsischen Signalweg (Caspase-8), zur frühen (Annexin V) bzw. fortgeschrittenen Apoptose (Caspase-3, fragmentierte DNA) und Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2	40
Tab. 7	Individuelle Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchung (Score) der Lebern und korrespondierender Nieren von ARPKD-Patienten zum extrinsischen Signalweg (Caspase-8), zur frühen (Annexin V) bzw. fortgeschrittenen Apoptose (Caspase-3, fragmentierte DNA) und Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2	42
Tab. 8	Übersicht publizierter klinischer Daten von ARPKD-Patienten	44
Anhang 1	Individuelle klinische Daten und genetische Befunde der Patienten	
Anhang 2	Individuelle Befunde der Nierenpräparate	
Anhang 3	Individuelle Befunde der Leberpräparate	

1. Einleitung

1.1 Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)

1.1.1 Übersicht

Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) ist durch polyzystische Nieren und eine kongenitale hepatische Fibrose (KHF) gekennzeichnet. Die ARPKD ist mit einer Inzidenz von 1:20.000 Lebendgeburten und einer Heterozygotenfrequenz von 1:70 eine wesentliche Todesursache von Neugeborenen und Säuglingen. Eine deutlich höhere Inzidenz (1:8.000) wird in konsanguinen Familien und in isolierten Populationen beobachtet (Kaariainen, H 1987; Zerres, K *et al.* 1998a). Die ARPKD tritt vor allem in der weißen Bevölkerung auf und betrifft beide Geschlechter gleichermaßen (Guay-Woodford, LM and Desmond, RA 2003). Die Erkrankung ist in der Niere durch fusiform dilatierte Sammelrohre, die radial Mark und Rinde durchziehen, und in der Leber durch eine generalisierte portale und interlobuläre Fibrose mit Gallengangshyperplasie gekennzeichnet. Zystische Malformationen in anderen Organen werden nicht beschrieben. (Blyth, H and Ockenden, BG 1971; Zerres, K *et al.* 1998b; Zerres, K *et al.* 1984). Die ARPKD beruht auf Mutationen im *PKHD1* (polycystic kidney and hepatic disease 1)-Gen, das das Transmembranprotein Fibrocystin / Polyductin (FPC) kodiert. FPC wird bevorzugt in den primären Zilien und dem apikalen Pol von Gallengangs- und tubulären Epithelzellen exprimiert (Ward, CJ *et al.* 2003).

1.1.2 Krankheitsverlauf und Diagnostik der ARPKD

Das klinische Spektrum ist variabel und hängt im Wesentlichen vom Manifestationszeitpunkt ab (Guay-Woodford, L 1996). In der Regel entwickeln Kinder mit einer schweren Nierenbeteiligung eine mildere KHF und umgekehrt. Zudem manifestieren sich die Nierenveränderungen meist früher als die Leberveränderungen (Lonergan, GJ *et al.* 2000). Es sind aber auch Fälle beschrieben, in denen Nieren und Leber gleichermaßen betroffen sind (Denamur, E *et al.* 2009). Meistens wird die Diagnose ARPKD pränatal oder in der frühen Neonatalperiode gestellt. Die schwersten Krankheitsbilder weisen die Patienten auf, die bereits bei der intra-uterinen Ultraschalluntersuchung (ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW)) mit einer Nephromegalie, einer erhöhten renalen Echogenität, einem hypoechogenen äußeren Kortextrand, einer Verstreichung der kortikomedullären Grenze, einer leeren Harnblase und einem Oligohydramnion auffallen (Blyth, H and Ockenden, BG 1971; Jain, M *et al.* 1997; Turkbey, B *et al.* 2009; Zerres, K *et al.* 1998a). Oligohydramnion sind prognostisch ungünstig und ziehen den Potter-Phänotyp nach sich, welcher im Wesentlichen aus einer Lungenhypoplasie, Gliedmaßenverkrümmungen und Gesichtsdysmorphie besteht (Potter, EL 1965; Zerres, K *et al.* 1998a; Zerres, K *et al.* 1984). Diese Gruppe macht ca. 40% der Fälle aus. In den ersten Stunden nach der Geburt versterben viele der erkrankten Neugeborenen an der Lungenhypoplasie, der Zwerchfellüberdehnung und der daraus resultierenden respiratorischen Insuffizienz (Guay-Woodford, LM and Desmond, RA

2003; Zerres, K *et al.* 1998b). Wird diese kritische Phase der respiratorischen Insuffizienz überlebt, limitieren die progrediente Niereninsuffizienz mit Oligurie/Überwässerung, die systemische Hypertonie mit Linksherzhypertrophie und Ernährungsprobleme bedingt durch die Kompression des Magens die Überlebenschancen (Bean, SA *et al.* 1995; Bosniak, MA and Ambros, MA 1975; Guay-Woodford, LM and Desmond, RA 2003). Der systemische Hypertonus, der die Folge einer intravasalen Volumenausdehnung und eines überstimulierten Renin-Angiotensin-Systems ist, entwickelt sich meist in den ersten Lebensmonaten und betrifft etwa 75% der Patienten (Bergmann, C *et al.* 2005; Kaplan, BS *et al.* 1989; Loghman-Adham, M *et al.* 2005). Ungefähr Zweidrittel der betroffenen Kinder überleben heute die Neonatalperiode und von diesen Kindern benötigen rund die Hälfte bis zum 10. Lebensjahr eine Nierenersatztherapie (Roy, S *et al.* 1997). Klinische Hinweise auf eine hepatische Beteiligung werden nur in ca. 50% der Neugeborenen mit ARPKD gefunden, wohingegen die KHF histologisch immer vorhanden ist (Dell, KM 2011). Da die Hepatozyten nicht betroffen sind, bleibt die Leberfunktion unbeeinflusst (Zerres, K *et al.* 1984). Anfangs meist klinisch stumm nimmt die Leberbeteiligung von der frühen Kindheit bis zum Erwachsenenalter stetig zu (Bosniak, MA and Ambros, MA 1975). Das Hauptproblem der KHF ist die portale Hypertension mit konsekutiver Splenomegalie, Knochenmarksdepression (Leukopenie, Thrombozytopenie) und der Gefahr von gastrointestinalen Blutungen (Bergmann, C and Zerres, K 2008). Bei ca. 40 % der Patienten zeigen sich exzessiv erweiterte Gallengänge im Sinne eines Caroli-Syndroms (Gunay-Aygun, M *et al.* 2013). Letzteres geht gehäuft mit Cholangitiden und einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Cholangiokarzinoms einher (Srinath, A and Shneider, BL 2012). Lebertransplantationen - oft auch aufgrund von rezidivierenden Cholangitiden - sind meist erst Jahre nach der Nierentransplantation und deutlich seltener simultan zu dieser notwendig (Chapal, M *et al.* 2012).

Die Diagnose einer ARPKD wird auf der Basis des sonografischen Befundes der Nieren und eines der folgenden Kriterien gestellt (Zerres, K *et al.* 1996): (1) klinische bzw. laborchemische Zeichen für eine Leberfibrose, ggf. in Kombination mit den Zeichen einer portalen Hypertension, (2) histologischer Nachweis einer Gallengangsdysplasie in der Leberbiopsie, (3) unauffällige Ultraschalluntersuchung der Nieren beider Eltern, (4) ARPKD bei einem betroffenen Geschwisterkind, (5) konsanguine Eltern. In unklaren Fällen und zur Sicherung der Diagnose wird eine DNA-Analyse durchgeführt, wobei prinzipiell die direkte und indirekte Mutationsanalyse möglich sind (Zerres, K *et al.* 1998a). Wenn die ARPKD pränatal diagnostiziert wird, wird den Eltern ein Schwangerschaftsabbruch mit medizinischer Indikation freigestellt (Bosniak, MA and Ambros, MA 1975).

1.1.3 Makroskopische und mikroskopische Eigenschaften der Nieren und Lebern von ARPKD-Patienten

In den ersten drei Lebensjahren der ARPKD-Patienten nehmen die Nieren stetig an Größe zu, bevor es entweder zu einer Stagnation oder gar zu einer Abnahme der Nierengröße kommt (Turbek, B *et al.* 2009). Makroskopisch sind die Nieren vergrößert, erhalten jedoch ihr nierenförmiges Aussehen. Histologisch sind beide Nieren mit radial angeordneten Zysten durchsetzt, diese entstammen Sammelrohren, die mit einschichtigem Zylinderepithel ausgekleidet sind und die Verbindung zum Tubulussystem nicht verlieren. Die Zysten haben einen uniformen Durchmesser von ca. 2 mm und erstrecken sich radial von Rinde zu Mark, allerdings nimmt die Gleichheit der Zysten im Verlauf der Kindheit ab und die Zysten werden runder. Alle anderen Strukturen wie Glomeruli und Nephronen zeigen keine Auffälligkeiten. Primär ist keine Fibrosierung des Stromas zu finden, diese entwickelt sich erst im Verlauf der Kindheit (Blyth, H and Ockenden, BG 1971; Zerres, K *et al.* 1984). Der Grad der Nierenfunktionseinschränkung und das Ausmaß der Nierenvergrößerung korrelieren mit der Zahl der betroffenen Sammelrohre (Lonergan, GJ *et al.* 2000).

Die Leber stellt sich im weiteren Verlauf vergrößert und verhärtet dar. Mikroskopisch findet sich eine periportale Fibrose mit dilatierten und proliferierenden Gallengängen, die durch einreihiges Zylinderepithel ausgekleidet sind. Die Lumen der Gallengänge sind leer oder enthalten eingedickte Galle, einige in Form von gerundeten Konkrementen. Die lobuläre Architektur ist weitgehend erhalten (Blyth, H and Ockenden, BG 1971; Summerfield, JA *et al.* 1986). Die Leberveränderungen resultieren aus einer Malformation der Duktalplatte mit sekundärer Störung der Gallengangsentwicklung und der Persistenz embryonaler Strukturen (Desmet, VJ 1992; Jorgensen, MJ 1977). Eine KHF ist nicht pathognomonisch für die ARPKD, sondern wird auch in anderen Syndromen beschrieben (Meckel-Syndrom, Vaginalatresie, Tuberöse Sklerose, Nephronophthie und selten bei der ADPKD (Landing, BH *et al.* 1980; Matsuda, O *et al.* 1990; Witzleben, CL and Sharp, AR 1982))

1.1.4 Fibrocystin (FPC) und die Zilien-Hypothese

FPC wird durch das *PKHD1*-Gen (6p21) codiert. *PKHD1* ist eines der längsten menschlichen Gene. Der längste offene Leserahmen umfasst 67 Exone und entspricht dem Transmembran-Protein FPC (Guay-Woodford, LM *et al.* 1995; Onuchic, LF *et al.* 2002; Zerres, K *et al.* 1994). FPC ist ein 447 kDa schweres Protein mit einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, einer nur wenige Aminosäuren umfassenden transmembranösen und einer aus 192 Aminosäuren bestehenden cytoplasmatischen Domäne am C-Terminus. Im extrazellulären Teil finden sich Protein-Interaktionsdomänen, der cytoplasmatische Teil weist Phosphorylierungsstellen auf (Follit, JA *et al.* 2010; Onuchic, LF *et al.* 2002; Ward, CJ *et al.* 2002). Dies führt zu der Annahme, dass FPC als Rezeptor fungiert und an der Signaltransduktion teilnimmt (Hiesberger, T *et al.* 2006; Nagano, J *et al.* 2005). Es wird angenommen, dass FPC an der Proliferation und Differen-

zierung von Epithelzellen maßgeblich beteiligt ist (Turkbey, B *et al.* 2009). FPC ist sowohl in den Sammelrohren gesunder Nieren von Embryonen, Neugeborenen und Erwachsenen als auch in den Cholangiozyten zu finden. Zur Expression von FPC in den Nieren der ARPKD-Patienten finden sich unterschiedliche Studienergebnisse, in denen sowohl die erniedrigte als auch die verstärkte Expression von FPC postuliert werden (Fischer, DC *et al.* 2009; Ward, CJ *et al.* 2003). Bislang wurden mehr als 300 Mutationen in der Locus-spezifischen Datenbank des FPC erfasst (<http://www.humgen.rwth-aachen.de/>). Dabei handelt es sich zu etwa 40% um trunkierende und zu etwa 60% um Missense-Mutationen. Etwa ein Drittel der Mutationen lassen sich jeweils nur in einer Familie nachweisen („private mutations“). Die Mutationen können prinzipiell alle Exone betreffen, dementsprechend schwierig ist die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp. In Europa kann in 17% der Fälle die Missense-Mutation T36M (c.107C>T, Exon 3) nachgewiesen werden (Harris, PC and Torres, VE 2009). Man geht davon aus, dass zwei trunkierende Mutationen letal sind und Patienten, die mindestens eine Missense-Mutation aufweisen, mildere Verläufe entwickeln (Bergmann, C *et al.* 2005; Ward, CJ *et al.* 2002). Allerdings ist dies keine allgemeingültige Regel, da auch bei Patienten mit nicht-trunkierenden Mutationen schwere Krankheitsverläufe vorkommen (Denamur, E *et al.* 2009).

Die führende Theorie zur Beschreibung der Pathophysiologie polyzystischer Nierenerkrankungen ist die „Zilien-Hypothese“, da die bei diesen Erkrankungen betroffenen Proteine in den primären Zilien bzw. Basalkörpern lokalisiert sind (Gascue, C *et al.* 2011; Guay-Woodford, LM 2006; Gunay-Aygun, M 2009; Kolb, RJ and Nauli, SM 2008; Watnick, T and Germino, G 2003; Zhang, Q *et al.* 2004). FPC und viele andere Zystoproteine sind in primären apikalen Zilien und den dazugehörigen Basalkörpern von Zilien-tragenden Zellen lokalisiert (Nauli, SM *et al.* 2003; Otto, EA *et al.* 2003; Pazour, GJ *et al.* 2002; Yoder, BK *et al.* 2002). Diese Zystoproteine treten nicht nur in den Nieren, sondern auch in anderen Organsystemen auf und interagieren miteinander. Dies erklärt die zum Teil ähnlichen Krankheitsbilder untereinander und die pleiotropen Phänotypen einzelner PKD (Hildebrandt, F and Otto, E 2005).

Die Nierenzysten und die vermehrten Gallengänge bei der ARPKD weisen darauf hin, dass das komplex regulierte Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose gestört ist (Denamur, E *et al.* 2009).

1.2 Zellproliferation

Zellproliferation bedeutet sowohl das Wachstum der einzelnen Zelle als auch die Zunahme der Zellzahl. In der Regel sind diese beiden Prozesse miteinander verknüpft und werden in engen Grenzen reguliert (Stolovich, M *et al.* 2002). Bei Säugetieren ist die Proliferation während der Organogenese und für die Geweberegeneration in reifen Organen ebenso unverzichtbar wie die Apoptose, also der geregelte Untergang von Zellen und Gewebe (siehe unten). Eine Erhöhung

der Zellmasse und symmetrische Zellteilung wird durch den G1 Cyclin / Cdk-Komplex gestartet. Dieser Komplex kann durch verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden und initiiert die DNA-Replikation (Pardee, AB 1989; Polymenis, M and Schmidt, EV 1999). Für Zellwachstum und Proliferation ist der durch Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), p70 ribosomale Protein S6 Kinase (pS6K) und Hamartin/Tuberin (tuberöse Sklerose Komplex, TSC1/TSC2) gebildete Signalweg von herausragender Bedeutung (*Abb.1*). Über diesen Signalweg wird die Synthese ribosomaler Komponenten und die Aktivierung der Translationsmaschinerie reguliert (Saucedo, LJ and Edgar, BA 2002; Tapon, N *et al.* 2001).

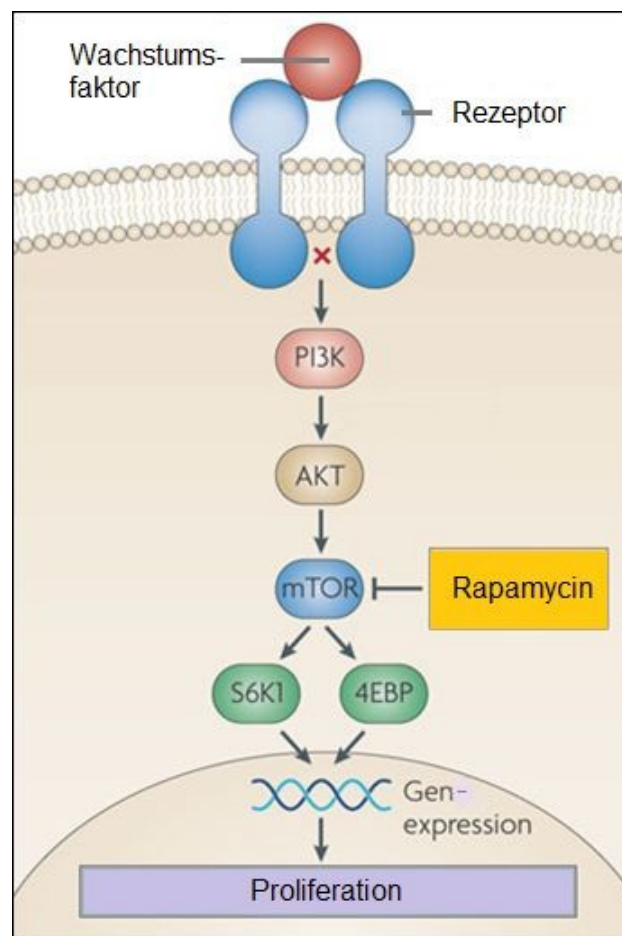


Abb. 1 Der PI3K-Signalweg (modifiziert nach (Atkins, MB *et al.* 2009))

Im Zentrum des PI3K-Signalweges steht mTOR, über das die Translation und der Zellzyklus initiiert werden. PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; S6K1: 70 ribosomales Protein S6 Kinase 1; 4EBP: eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1.

1.2.1 Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)

Die PI3Ks werden anhand ihrer primären Struktur und Substratspezifität in drei Unterklassen eingeteilt, wobei für den Signalweg über mTOR die Enzyme der Klasse I von entscheidender Bedeutung sind. Klasse I PI3Ks sind Heterodimere aus einer katalytischen Untereinheit und einer Adapter-/Regulationsuntereinheit (Fruman, DA *et al.* 1998; Vanhaesebroeck, B and Waterfield, MD 1999). Sobald an einen zellmembranständigen Wachstumsfaktor-Rezeptor der passende Ligand bindet, induziert dieser Rezeptor über die PI3Ks die Phosphorylierung von Membran-Phosphoinositiden an der 3'-Position des Inositols und diese Inositol-3-phosphate dienen als intrazelluläre Botenstoffe. Zu ihnen gehören Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PtdIns(3,4)) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PtdIns(3,4,5)), die an Phe-Tyr-Val-Glu (FYVE) und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen, die in einer Vielzahl von Proteinen vorkommen, binden (Saucedo, LJ and Edgar, BA 2002; Stolovich, M *et al.* 2002; Vanhaesebroeck, B and Waterfield, MD 1999). Zwei dieser Proteine sind die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) und Akt, die essentiell für die PI3K Signalausbreitung sind (Alessi, DR *et al.* 1997; Burgering, BM and Coffey, PJ 1995; Klippel, A *et al.* 1997). Die Aktivierung des PI3K Signalweges stimuliert die Fettsäureaufnahme, den Glucose-Import sowie die Synthese von Glykogen, Lipiden und Proteinen (Saltiel, AR and Kahn, CR 2001).

1.2.2 Akt - ein Protein zwischen Proliferation und Apoptose

Akt, auch als Proteinkinase B (PKB) bekannt, besteht aus einer N-terminalen PH-Domäne, einer Kinase-Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Region. Für die vollständige Aktivierung von Akt muss Ser473 in der C-terminalen Region durch den Rictor-mTOR-Komplex und Thr308 in der Kinase-Domäne durch PDK1 phosphoryliert werden (Alessi, DR *et al.* 1996; Alessi, DR *et al.* 1997; Sarbassov, DD *et al.* 2005b; Vanhaesebroeck, B and Waterfield, MD 1999). Die Bindung von PtdIns(3,4) an die PH-Domäne von Akt führt zur Aktivierung durch PDK1 und Dimerisierung dieser Proteinkinase, die dann sowohl Apoptose als auch Zellwachstum, Proliferation und Migration reguliert (*Abb. 2*) (Alvarez, B *et al.* 2003; Cain, RJ and Ridley, AJ 2009; Chang, F *et al.* 2003; Franke, TF *et al.* 1997; Klippel, A *et al.* 1997; Pene, F *et al.* 2002). Akt fungiert als Schaltstelle zwischen Proliferation und Apoptose (del Peso, L *et al.* 1997). Dabei fördern Pro-Überlebens-Signale die Expression und/oder Aktivität von Akt, wohingegen Akt während der Apoptose durch Caspasen gespalten und deaktiviert wird (Bachelder, RE *et al.* 1999; Rokudai, S *et al.* 2000; Vogelstein, B and Kinzler, KW 2004). Akt führt zur Unterdrückung des programmierten Zelltodes, indem es proapoptotische Proteine wie Caspase-9, den Forkhead Transkriptionsfaktor sowie das Bcl-2-inhibierende BH-3-only-Protein Bad phosphoryliert und deren Funktionen hemmt (Brunet, A *et al.* 1999; Cardone, MH *et al.* 1998; Datta, SR *et al.* 1997). Neben dieser anti-apoptotischen Wirkung ist die Aktivierung von mTOR wesentlich für Zellwachstum und Proliferation (Sarbassov, DD *et al.* 2005a).

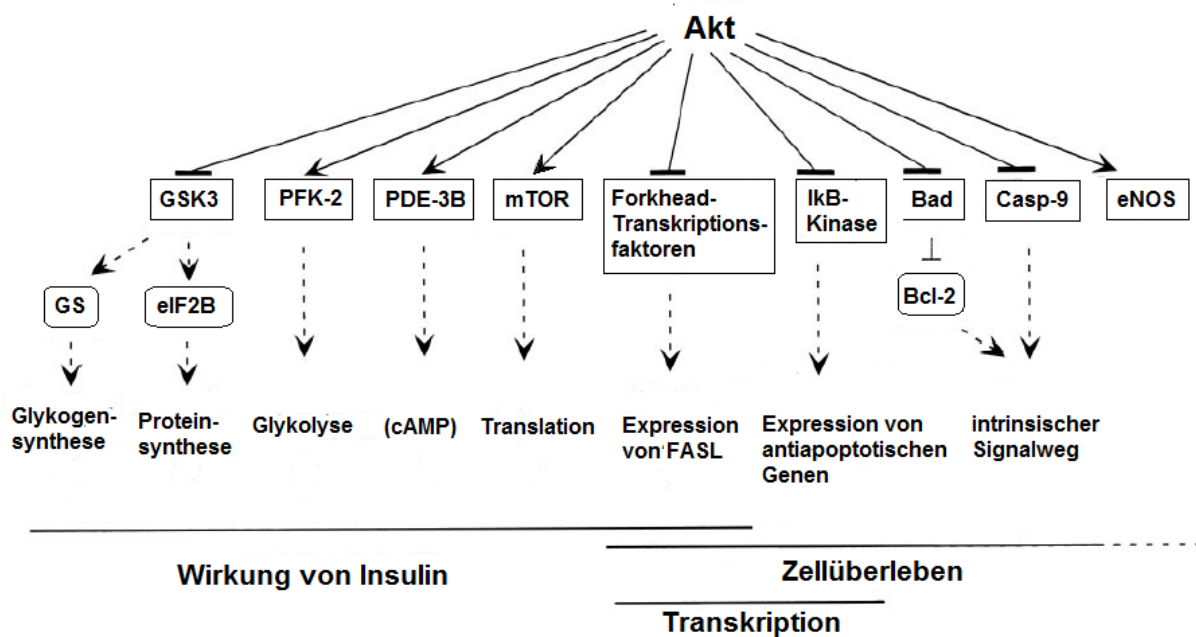


Abb. 2 Zielproteine von Akt (modifiziert nach (Vanhaesebroeck, B and Waterfield, MD 1999))

Akt ist ein wichtiger Regulator der von Wachstumsfaktoren abhängigen Signalwege und der Überlebenssignale der Zelle. GSK3: Glykogen Synthase Kinase 3; GS: Glykogen-Synthase; eIF2B: eukaryotischer Initiationsfaktor 2B; PFK-2: Phosphofruktokinase-2; PDE-3B: Phosphodiesterase-3B; mTOR: mammalian target of rapamycin; IκB-Kinase: Inhibitor of NF-κB-Kinase; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase.

1.2.3 mTOR - das zentrale Protein des PI3K-Signalweges

mTOR auch als FRAP (FKBP-Rapamycin 12-assoziiertes Protein) bezeichnet, ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch das Medikament Rapamycin gehemmt werden kann (Chung, J *et al.* 1992; Zaragoza, D *et al.* 1998). mTOR besitzt zwei benachbarte Phosphorylierungsstellen (Thr2446 und Ser2448), wobei Ser2448 direkt durch Akt phosphoryliert wird (Nave, BT *et al.* 1999; Sekulic, A *et al.* 2000). Die vollständige Aktivierung von mTOR erfordert, dass die hemmende Wirkung des TSC1/TSC2-Komplexes aufgehoben wird. Dies geschieht durch die Akt-abhängige Phosphorylierung von TSC2 (Inoki, K *et al.* 2002; Manning, BD *et al.* 2002; Sarbassov, DD *et al.* 2005a).

Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion von mTOR mit Raptor (mTOR-Komplex 1; mTORC1) und Rictor (mTORC2), da unter klinisch-therapeutischen Bedingungen nur mTORC1 durch Rapamycin gehemmt werden kann (Sarbassov, DD *et al.* 2005a; Wang, X and Proud, CG 2006). Sowohl mTORC1 als auch mTORC2 phosphorylieren die Regulatoren der Protein-Translation. Dieses sind einerseits das die Proteinsynthese stimulierende pS6K und andererseits der die Translation hemmende Faktor 4EBP1 (eukaryotische Initiationfaktor 4E bindendes Protein) (Fingar, DC *et al.* 2002). Die Phosphorylierung von 4EBP1 an Thr389 führt zur Dissoziati-

on von 4EBP1 und dem RNA-Cap-bindenden Protein eIF4E, welches nun die Translation initiieren kann (Brunet, A *et al.* 1999; Gingras, AC *et al.* 2001). mTORC2 ist zudem an der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Aktivierung von Akt beteiligt (Abb. 3) (Lee, S *et al.* 2005; Schmidt, A *et al.* 1996).

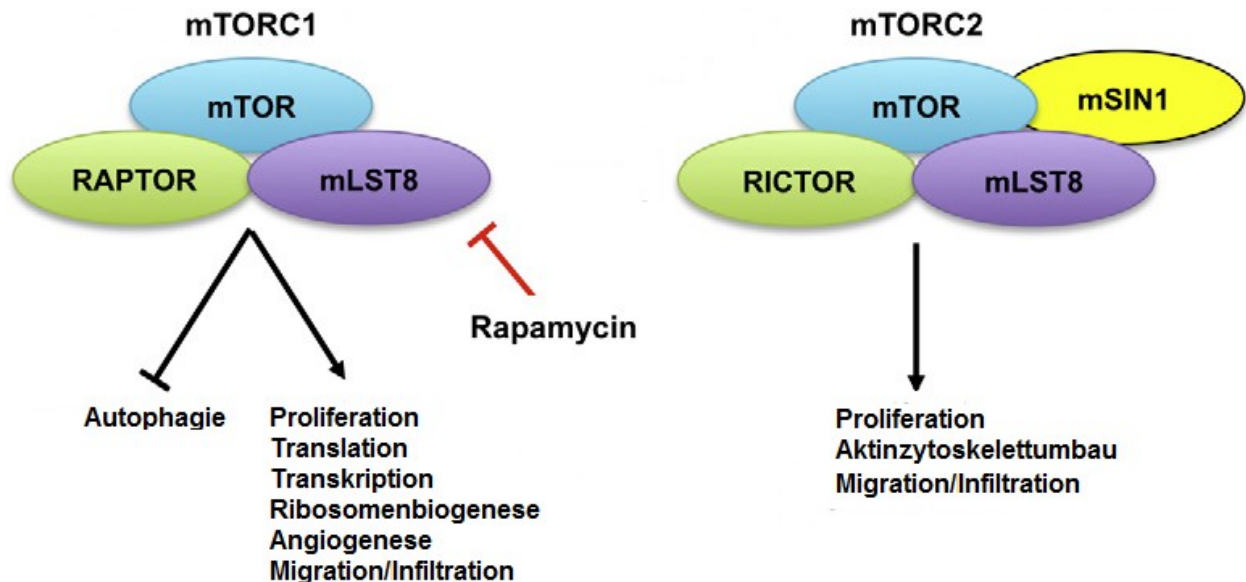


Abb. 3 mTOR-Komplex 1-(mTORC1) und mTORC2 mit ihren Funktionen im Zellzyklus (modifiziert nach (Zaytseva, YY *et al.* 2012))

1.2.4 pS6K - ein bedeutendes Zielprotein von mTOR und Schlüsselregulator der Proteintranslation

pS6K ist eine Serin/Threonin-Kinase, die über PI3K durch mTOR-abhängige und -unabhängige Mechanismen aktiviert wird, wobei sequentiell Ser374, Ser411, Ser418, Thr421 und Ser424 in der C-terminalen Pseudosubstrat-Region gefolgt von Ser404, Thr389 und Thr229 phosphoryliert werden (Dennis, PB *et al.* 1998; Moser, BA *et al.* 1997; Pullen, N and Thomas, G 1997; Stolovich, M *et al.* 2002). Die Kinase(n), die die Pseudosubstrat-Region phosphorylieren, sind noch nicht genau identifiziert. Fest steht jedoch, dass die Phosphorylierungen von Thr389 durch mTOR und an Thr229 durch PDK1 erfolgen (Burnett, PE *et al.* 1998; Pullen, N *et al.* 1998). pS6K phosphoryliert ihrerseits das ribosomale Protein S6, eine Komponente der 40S-ribosomalen Untereinheit, und die eEF2-Kinase, wodurch eine gesteigerte Translation spezifischer mRNAs bewirkt wird, was das Zellwachstum fördert und eine Rolle bei der Regulation des G1/S Kontrollpunktes des Zellzyklus spielt (Pene, F *et al.* 2002; Wang, X *et al.* 2001). P6SK ist zudem an der negativen Rückkopplung des PI3K-Signalweges beteiligt, indem es durch Phosphorylierung von Rictor an Thr1135 mTORC2 hemmt und folglich die Aktivierung von Akt über mTORC2 aufhebt (Dibble, CC *et al.* 2009).

1.3 Die Apoptose

Mit Apoptose wird ein natürliches und stereotyp ablaufendes „Selbstmordprogramm“ der Zelle beschrieben, die für die Entwicklung und Homöostase vielzelliger Organismen zentral ist (Jacobson, MD *et al.* 1997). Sie läuft während der Organogenese sowie bei allen physiologischen und pathologischen Umbauprozessen ab und steht mit der Proliferation im Gleichgewicht (Bonventre, JV and Weinberg, JM 2003; Kerr, JF *et al.* 1972; Kim, J *et al.* 1996; Kuure, S *et al.* 2000; Thompson, CB 1995; Vaux, DL *et al.* 1994). Während der Organogenese werden viele Zellen im Überschuss produziert, die schließlich durch programmierten Zelltod untergehen (Meier, P *et al.* 2000). Demzufolge könnte eine gestörte Apoptose während der Organogenese von Nieren und Lebern zum progressiven Wachstum der Zysten und Gallengänge in der ARPKD beitragen.

Apoptose kann sowohl über einen intrinsischen als auch über einen extrinsischen Signalweg initiiert werden (Jin, Z and El-Deiry, WS 2005; Shi, Y 2002) (*Abb. 4*). Der intrinsische Signalweg wird beispielsweise durch DNA-Schädigung oder durch oxidativen Stress ausgelöst und wird im Allgemeinen über eine Beteiligung der Mitochondrien initiiert, wohingegen der extrinsische Weg durch Todesrezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt wird (Ashkenazi, A and Dixit, VM 1998; Jin, Z and El-Deiry, WS 2005). Unabhängig vom auslösenden Ereignis ist die Apoptose durch die kaskadenförmige Aktivierung von Caspasen gekennzeichnet. Abschnürungen der Zellmembran (blebbing) zu Vesikeln, Zellschrumpfung, Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung bilden die charakteristischen Merkmale apoptotischer Zellen (Kerr, JF *et al.* 1972; Sorenson, CM 1998). Die abgeschnürten Vesikel und der geschrumpfte Zellkörper werden schließlich durch Makrophagen oder benachbarte Zellen phagozytiert. Da hierbei kein Zellinhalt austritt, unterbleibt auch eine entzündliche Antwort im angrenzenden Gewebe (Savill, J and Fadok, V 2000).

1.3.1 Die Caspasen – die wichtigsten Proteasen der Apoptose

Die an der Apoptose beteiligten Caspasen werden als Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) zusammengefasst, wobei die Effektorcaspasen von Initiatorcaspasen gespalten und damit auch aktiviert werden (Shi, Y 2002; Zimmermann, KC *et al.* 2001). Die Caspasen werden als Proenzyme exprimiert und enthalten 3 Domänen: eine N-terminale Prodomäne, eine lange Untereinheit die das aktive Zentrum enthält und eine C-terminale kleine Untereinheit (Stennicke, HR and Salvesen, GS 1998). Um die volle Funktionsfähigkeit zu erhalten, muss zuerst die kleine C-terminale Untereinheit und dann die N-terminale Prodomäne gespalten werden. Die aktive Caspase ist ein Tetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten, mit zwei aktiven Zentren (Wolf, BB and Green, DR 1999). Eine Ausnahme bildet Caspase-9, die nur ein aktives Zentrum besitzt (Renatus, M *et al.* 2001).

Die Initiatorcaspasen sind autoaktivierend und würden ohne Regulation zu einer unkontrollierten Aktivierung der Effektorcaspasen führen. Daher ist die Aktivierung der Initiatorcaspasen an die

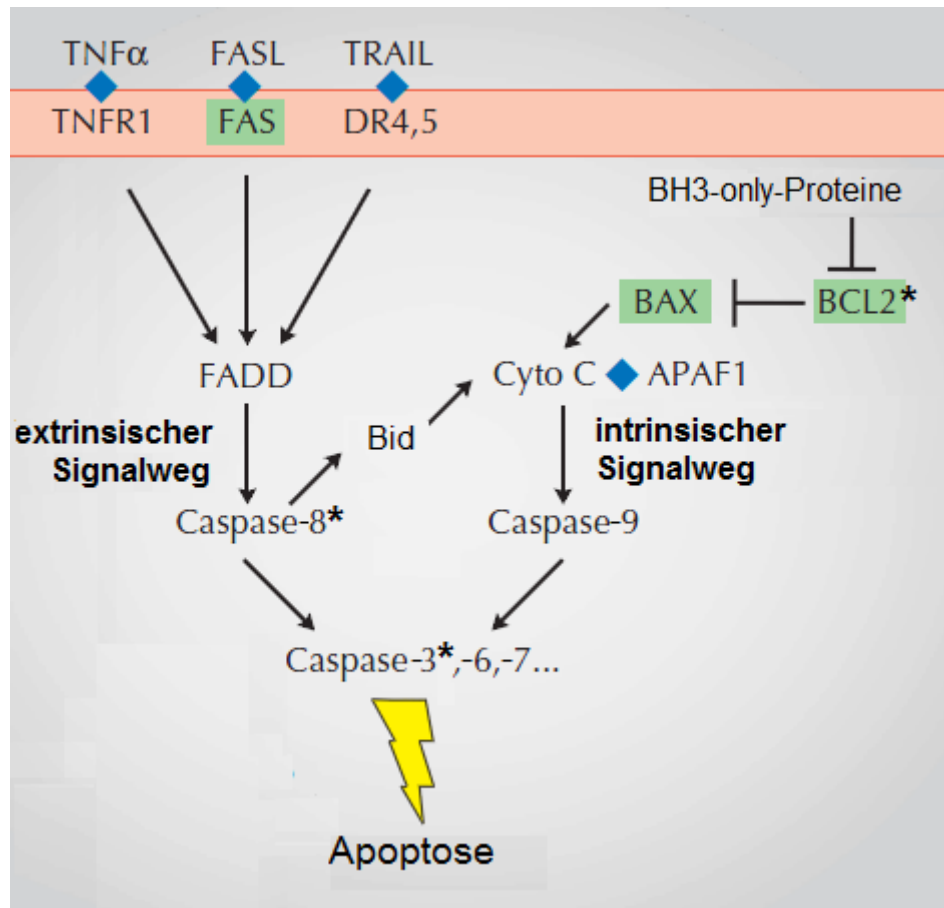


Abb. 4 Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose (modifiziert nach (Vogelstein, B and Kinzler, KW 2004))

TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; FADD: Fas-assoziierte Todesdomäne; APAF1: Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1; *Apoptosemarker, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Bildung eines Mehrkomponenten-Komplexes („death-inducing signaling complex“; DISC) geknüpft (Shi, Y 2002). In diesen Mehrkomponenten-Komplexen wird die Homo-Dimerisierung und Autokatalysierung von Caspase-9 aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration gefördert. Gleichermäßen induziert der DISC die Dimerisierung und anschließende automatische Aktivierung von Caspase-8 (Boatright, KM *et al.* 2003; Donepudi, M *et al.* 2003).

Die Effektorcaspasen spalten mehr als 100 Substrate, die sich als (1) direkte Regulatoren der Apoptose, (2) Mediatoren und Regulatoren der apoptotischen Signaltransduktion (z.B. Proteinkinasen), (3) Strukturproteine, (4) zelluläre Reparatur-Proteine (5) Zellzyklus-regulierende Proteine und (6) Proteine, die in menschliche Pathologien beteiligt sind, klassifizieren lassen (Degtrev, A *et al.* 2003). So spalten die Effektorcaspasen unter anderem die für das Zytoskelett bedeutsamen Proteine Aktin und Fodrin, aber auch die Poly (ADP-Ribose)-Polymerase und Laminin als wichtigen Bestandteil der Extrazellulärmatrix (Kaufmann, SH *et al.* 1993; Kayalar, C *et al.* 1996; Martin, SJ *et al.* 1995; Neamati, N *et al.* 1995). Zu den typischen

Oberflächenveränderungen apoptotischer Zellen gehören der Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran und die Translokation von Phosphatidylserinen (PS) (Annexin V) vom inneren Blatt der Lipiddoppelschicht nach außen. Diese Exposition von PS tritt schon sehr früh während des apoptotischen Prozesses auf und fungiert als „Komm und Iss mich“-Signal für die phagozytierenden Zellen (Savill, J and Fadok, V 2000; Schlegel, RA and Williamson, P 2001). Die DNA-Fragmentierung wird durch Aktivierung des DNA fragmentierenden Faktors (DFF) eingeleitet. DFF besteht aus einer Caspasen-aktivierten DNase (CAD)/DFF 40 und der die DNase-Funktion inhibierenden Untereinheit iCAD/DFF 45. In lebenden Zellen liegt DFF als Komplex aus DNase und Inhibitor vor. ICAD/DFF 45 wird durch Caspase-3 an der N-terminalen CIDE-N Interaktionsdomäne gespalten, was die ICAD/DFF45-vermittelte Unterdrückung der katalytischen CAD/DFF40 Untereinheit aufhebt. Dadurch wird die DNA-Fragmentation in A/T reichen Regionen eingeleitet und 50 bis 200 kb Fragmente entstehen (Danial, NN and Korsmeyer, SJ 2004; Enari, M *et al.* 1998; Liu, X *et al.* 1997; Sakahira, H *et al.* 1998).

1.3.2 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch Stimulierung verschiedener zusammenfassend als „Todesrezeptoren“ bezeichnete Proteine auf der Zelloberfläche initiiert. Diese „Todesrezeptoren“ gehören zur Supergen-Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-R) und sind neben TNF- auch TRAIL- und Fas-Rezeptoren, wobei Fas-R auch unter der Bezeichnung CD95 "death receptor" oder APO-1 bekannt ist (Gruss, HJ and Dower, SK 1995; Jin, Z and El-Deiry, WS 2005; Smith, CA *et al.* 1994). Diesen Rezeptoren ist neben einer cysteinreichen extrazellulären auch eine als Todesdomäne bezeichnete cytoplasmatische Domäne gemeinsam (Nagata, S 1997; Tartaglia, LA *et al.* 1993). Die Aktivierung der Todesrezeptoren aktiviert innerhalb von Sekunden Caspasen, die binnen weniger Stunden zum irreversiblen apoptotischen Untergang der Zelle führen (Anichini, A *et al.* 2006). Fas ist der bedeutendste Todesrezeptor und spielt eine wichtige Rolle bei (1) der Eliminierung aktivierter reifer T-Zellen zur Beendigung einer Immunantwort, (2) der Eliminierung Virus-infizierter oder maligner Zellen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killer-Zellen und (3) der Eliminierung von Entzündungszellen an immunprivilegierten Orten wie z. B. dem Auge (Ashkenazi, A and Dixit, VM 1998; Nagata, S 1997). Die Bindung von FasL an Fas induziert die Trimerisierung der Rezeptoren und die nachfolgende Aktivierung der intrinsischen Kinase-Aktivität der Todesdomäne (Nagata, S 1997). Dies rekrutiert das Adapter-Protein Fas-associated death domain (FADD) und bindet die Pro-Caspase-8, welche zusammen den DISC bilden (Jin, Z and El-Deiry, WS 2005). Schließlich führt die autokatalytische Aktivierung der Caspase-8 zur Aktivierung der Effektorencaspasen-3, -6 und -7 (Ashkenazi, A and Dixit, VM 1998).

Die aktivierte Caspase-8 und -10 sind Marker des extrinsischen Signalweges, wobei speziell Caspase-8 für den Todesrezeptor-vermittelten apoptotischen Signalweg unabdingbar ist (Ribas, J *et al.* 2005; Varfolomeev, EE *et al.* 1998).

1.3.3 Der intrinsische Signalweg

Durch unspezifische Schädigungen der Zelle, z.B. Doppelstrangbrüche der DNA, wird der intrinsische Signalweg initiiert, wobei der durch Bax/Bak induzierte Übertritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma entscheidend ist (Zimmermann, KC *et al.* 2001). Zytoplasmatisches Cytochrom c bindet in Gegenwart von ATP bzw. dATP an den Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) und die Procaspase-9, welche den intrazellulären DISC, das Apoptosom, bilden (Cain, K *et al.* 2000; Shi, Y 2002). Das Apoptosom, welches die Autoaktivierung von Caspase-9 ermöglicht und zudem deren katalytische Aktivität um das 100-fache erhöht, ist ein Heptamer bestehend aus sieben Apaf-1-Molekülen, die jeweils ein Molekül Cytochrom c und ein Caspase-9-Dimer binden (Acehan, D *et al.* 2002; Cain, K *et al.* 2000; Rodriguez, J and Lazebnik, Y 1999). Durch die Aktivierung der Caspase-9 wird eine Caspase-Kaskade generiert, die letztendlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 und zur Auflösung der Zelle führt (Goilav, B *et al.* 2008; Shi, Y 2002).

1.3.4 Bcl-2 – ein Modulator des intrinsischen Signalweges

Die Mitglieder der Bcl-Familie wirken sowohl pro- als auch antiapoptotisch und regulieren die Induktion des intrinsischen Signalweges. Sie alle enthalten mindestens eine und höchstens vier BH-Domänen, d.h. Domänen mit hoher Homologie zum Bcl-2 (Bcl-2-Homologie, BH). Entsprechend ihrer Struktur und Funktion werden sie in drei Gruppen unterteilt. Die antiapoptotischen Mitglieder in Gruppe 1 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1 und Mcl-1) verfügen über alle vier Homologiedomänen BH1-4 und fördern das Überleben der Zelle. Die beiden anderen Gruppen lösen hingegen den Zelltod aus. Die Gruppe 2 (Bax, Bak und Bok) umfasst Proteine, die in BH1, 2 und 3 eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, die Mitglieder der Gruppe 3 (Bid, Bad und Bim) zeigen lediglich in BH3 eine Sequenzhomologie - sie werden daher auch als BH3-only-Proteine bezeichnet (Jin, Z and El-Deiry, WS 2005). Zur Einleitung der Apoptose sind beide proapoptotischen Gruppen erforderlich (Zong, WX *et al.* 2001). Die Familie der Bcl-2-Proteine registriert intrazelluläre Schäden, DNA-Schäden und zytotoxische Stimuli wie zum Beispiel Zytokin-Mangel, Exposition gegenüber Glucocorticoiden, ultraviolette und γ -Strahlung oder Staurosporin (Adams, JM and Cory, S 1998).

Ein wichtiges Mitglied und Namensgeber dieser Proteinfamilie ist der antiapoptotische Faktor Bcl-2, dieser befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der äußeren mitochondrialen Membran, des endoplasmatischen Retikulum (ER), und der Kernhülle (Hockenbery, DM *et al.* 1993; Jacobson, MD *et al.* 1993). Er ist bei der Stabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials und zur Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen pro- und antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2-Protein-Familie beteiligt (Danial, NN and Korsmeyer, SJ 2004). Ein wichtiges Ereignis im intrinsischen Signalweg ist die mitochondriale äußere Membranpermeabilisierung („mitochondrial outer membrane permeabilization“ MOMP)(Green, DR and Kroemer, G 2004). Dabei binden und hemmen BH3-only-Proteine

Bcl-2, was die Oligomerisierung des proapoptotischen Bax und Bak ermöglicht und in der Freisetzung von Cytochrom c mündet (Korsmeyer, SJ *et al.* 2000; Zong, WX *et al.* 2001).

1.3.5 Überschneidungen des intrinsischen und extrinsischen Signalweges

Die Zellen, die durch den extrinsischen Signalweg die Apoptose initiieren, können anhand der Involvierung des intrinsischen Signalweges in Zelltyp 1 und 2 eingeteilt werden. In Zelltyp 1 sind die Aktivität von Caspase-8 und DISC so effizient, dass die Apoptose eingeleitet wird. In Zelltyp 2 hingegen wird nur eine kleine Menge von Caspase-8 und FADD zum DISC rekrutiert, sodass die Einbeziehung des mitochondrialen Signalweges zur Ausführung der Apoptose notwendig ist (Scaffidi, C *et al.* 1998). Dabei aktiviert Caspase-8 das BH3-only-Protein Bid und führt über Hemmung von Bcl-2 zur MOMP (Li, H *et al.* 1998; Luo, X *et al.* 1998). Sowohl in Zelltyp 1 als auch Zelltyp 2 wird der mitochondriale Signalweg aktiviert, aber nur in Zelltyp 2 kann die Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 verhindert werden (Danial, NN and Korsmeyer, SJ 2004) (Abb. 5).

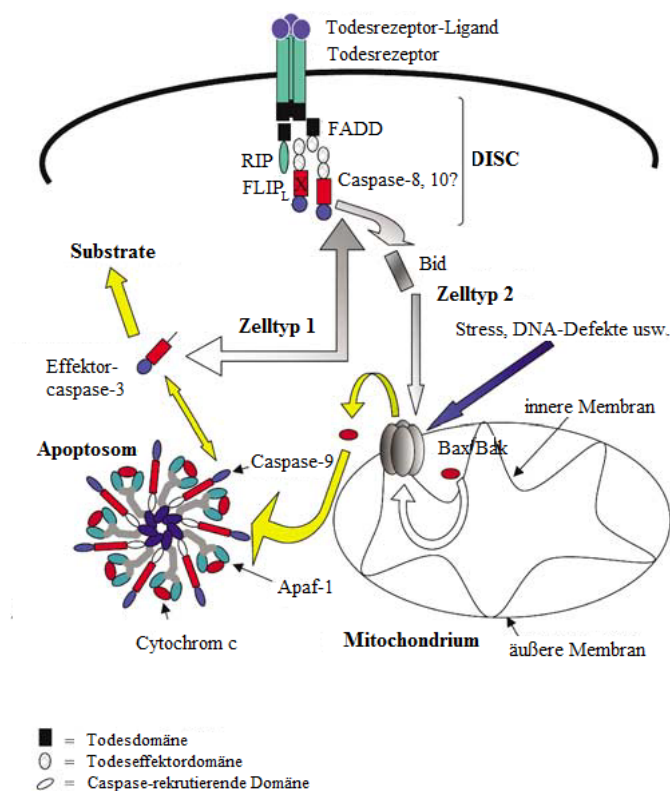


Abb. 5 Überschneidungen des intrinsischen und extrinsischen Signalweges (modifiziert nach (Degterev, A *et al.* 2003))

Apaf-1: Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1; DISC: Tod-induzierender Signalkomplex; FADD: Fas-assoziierte „Todesdomäne“; RIP: receptor interacting protein; FLIP = FADD-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein.

2. Ziel der Arbeit

Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) ist mit einer Inzidenz von 1:20.000 Lebendgeburten relativ selten, jedoch durch das schwere Krankheitsbild eine wesentliche Todesursache von Neugeborenen und Säuglingen. Da die ARPKD - bedingt durch den rezessiven Erbgang - mit einer leeren Familienanamnese einhergeht, wird die Diagnose meist erst ab der 20. Schwangerschaftswoche mittels Ultraschall gestellt. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die Veränderungen in Niere und Leber schon so weit fortgeschritten, dass durch die im Moment zur Verfügung stehenden Medikamente ein Fortschreiten der Zystenexpansion bzw. der Gallengangsdilatation und die Fibrosierung der Organe nicht verhindert werden kann. Man vermutet, dass ein gestörtes Gleichgewicht von Apoptose und Proliferation in den Epithelien zur Progression der Erkrankung beiträgt. Das für die ARPKD betroffene Gen *PKHD1* codiert für das Protein Fibrocystin, das seinerseits für Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen verantwortlich ist. Es wird bevorzugt in den primären Zilien und dem apikalen Pol sowohl von Sammelrohren als auch Cholangiozyten exprimiert.

Das Ziel der Arbeit war es, die Verteilung und Lokalisation von proliferierenden sowie apoptotischen Zellen in Nieren und Lebern von ARPKD-Patienten zu analysieren. Hierzu sollten aktive Isoformen von Regulator-Kinasen der Proliferation und Apoptose immunhistochemisch nachgewiesen und die Ergebnisse zueinander in Beziehung gesetzt werden. Zur Beurteilung der Proliferation ist der PI3K-Signalweg mit pAkt, pmTOR und pS6K sowie der Proliferationsmarker Ki-67 untersucht worden. In der Apoptose wurden Marker des extrazellulären Signalweges (aktivierte Initiatorcaspase-8), der frühen (Annexin V) und späten Apoptose (aktivierte Effektorcaspase-3 und fragmentierte DNA) sowie Bcl-2 als antiapoptotischer Faktor detektiert.

3. Material und Methoden

3.1 Präparate und Reagenzien

3.1.1 Präparate

Diese retrospektive Multizenterstudie zur (immun)histomorphologischen Charakterisierung an Nieren und Lebern wurde von der Ethikkommission Rostock (Geschäftszeichen A20/2007) genehmigt. Es wurden Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Präparate von Patienten mit klinisch und/oder genetisch gesicherter ARPKD untersucht. Die Präparate wurden von den Zentren für Pädiatrische Nephrologie in Berlin, Hamburg, Hannover, Münster, Prag und Rostock zur Verfügung gestellt. Alle Organe wurden unmittelbar nach Entnahme von einem Pathologen begutachtet. Von den Patienten standen uns die Krankengeschichte mit klinischen Angaben und den Ergebnissen der pathologischen Begutachtung zur Verfügung. Bei zwei von drei Patienten (HRO2, MS5), bei denen eine zweizeitige Nephrektomie durchgeführt wurde, analysierten wir das Material von beiden Nieren. Gesunde Nieren und Lebern stammten von Kindern, die eines unnatürlichen Todes unabhängig von Nieren- oder Lebererkrankungen starben.

Anzahl:

aller Patienten (m/w)	16 (9/7)
nephrektomierter Patienten / Nierenpräparate	15 / 17
lebertransplantierte Patienten / Leberpräparate	7 / 7

3.1.2 Reagenzien für morphologische und immunhistochemische Untersuchungen

3.1.2.1 Chemikalien und Antikörper

Die Grundchemikalien hatten, soweit nicht im Folgenden aufgeführt, mindestens p. a. Qualität und wurden bei Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) gekauft. Für morphologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden die Präparate auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen.

Gibco (Darmstadt):

Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Merck (Darmstadt):

Eindeckmittel Aquatex und Entellan, Mayers Hämalaun (gebrauchsfertig), FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim):

Di-aminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) in Tablettenform (10mg/Tbl.)

Vector Laboratories über Biozol (Eching):

Vectastain Elite ABC -Kit (Universal), Normal Horse-Serum, Biotin-konjugiertes Pan-Spezifisches Antiserum vom Pferd gegen Maus-, Kaninchen- und Ziegen-IgG (Horse Anti-Mouse/Rabbit/Goat IgG), Avidin/Biotin Blocking Kit, Polyklonale Maus-IgG-Antikörper, Polyklonale Kaninchen-IgG-Antikörper

Tab. 1 In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Antigen	Typ/Klon	Epitop	Firma/Katalog-Nr.
pAkt	Kaninchen polyklonales Antiserum keine Daten	AS-Sequenz mit pThr308	Santa Cruz Biotechnology #sc-16646-R
Annexin V	Maus mAK (IgG ₁) AN5	keine Daten	Sigma-Aldrich #A 8604
Bcl-2	Maus mAK (IgG ₁) 100	AS 41-54	Santa Cruz Biotechnology #sc-509
	Kaninchen-polyklonales Antiserum C21	AS 1-205	Santa Cruz Biotechnology #sc-783
Caspase-3	Kaninchen mAK (IgG) 5A1	Asp 175 aktivierte Caspase-3	Cell Signaling Technology #9664
	Kaninchen-polyklonales Antiserum keine Daten	aktiviertes p7 Fragment	Millipore #AB3623
Caspase-8	Maus mAK (IgG ₁) 8CSP03	Caspase-8	Santa Cruz Biotechnology #sc-56070
	Kaninchen-polyklonales Antiserum keine Daten	keine Daten	Atlas Antibodies #HPA001302
Ki-67	Maus mAK (IgG _{17k}) MIB-1	keine Daten	Dako #M7240
pmTOR	Kaninchen mAK (IgG) 59F9	pSer2448	Cell Signaling Technology #2976
p70S6K	Maus mAK (IgG _{2a}) 1A5	pThr389	Cell Signaling Technology #9206

3.1.2.2 Zusammensetzungen selbst hergestellter Puffer und Waschlösungen

Citratpuffer:

0,1M Citronensäure-Monohydrat und 0,1M tri-Natriumcitrat-Dihydrat gegeneinander bis pH 6,0 titriert

5x Tris buffered saline (5x TBS) für die DAB-Lösung der ABC-Methode:

0,1M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 1,5M NaCl; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

1x Tris buffered saline (TBS) für den TUNEL Assay:

20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 140mM NaCl; mit HCl auf pH 7,6 eingestellt

Tris-HCl:

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), mit HCl auf pH 8 eingestellt

DAB-Lösung für die Färbung mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern:

4 ml 5x TBS, 16 ml Aqua dest., 10mg DAB, 6,4µl H₂O₂ (30%)

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Ionenaustauscher Typ Destillo 20) angesetzt.

3.1.2.3 Laborgeräte und Programme

Für die Auswertung bzw. Beurteilung standen ein manuelles Mikroskop mit digitalen Kameras und korrespondierender Software der Firma Leica (Leica, Wetzlar) zur Verfügung (Hardware: Mikroskop Leica DMI 4000, DFC 320 R2 (Farbkamera) sowie DFC 350 Fx (Schwarz-/Weißkamera), Software: für die Bildaufnahme Leica Application Suite (Version 3.6) und für die qualitative Bildanalyse LeicaQWin (Version 3.5.1)). Für die Berechnung der Größenperzentilen bzw. des Standard Deviation Scores (SDS) wurde das Programm Growth Analyser (Version 3.0) eingesetzt, als Referenzgruppe dienten die 1998 an deutschen Kindern erhobenen Daten. Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Stat (Version 3.5); Graphiken wurden mit Sigma Plot (Version 10.0) erstellt.

3.2 Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen

3.2.1 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Alle Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Diese Präparate dienten zur Übersicht, der generellen Beurteilung und im Falle der Nierenpräparate zur Bestimmung der relativen Parenchymfläche. Die Gewebeschnitte wurden zuerst 2 x 15 min in Xylon entparaffiniert und daraufhin über eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert.

- | | |
|---|--------|
| 1. Mayers Hämalaun | 6 min |
| 2. Bläuen unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser | 10 min |
| 3. Eosin G-Lösung (0,1%) | 3 min |
| 4. Spülen in Aqua dest. | |
| 5. Aufsteigende Alkoholreihe
(je kurz in Ethanol 70%, 80%, 90% und 96% eintauchen) | |
| 6. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier | |
| 7. Entwässern mit Xylol | 10 min |
| 8. Eindecken mit Entellan | |

3.2.2 Immunhistochemische Färbungen mit der Avidin-Biotin-Complex-Technik (ABC-Methode)

Zum immunhistochemischen Nachweis spezifischer Antigene wurde die indirekte Färbung mit der Avidin-Biotin-Complex-Technik (ABC-Methode) angewendet. Die gebundenen Primärantikörper wurden durch Inkubation mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper und nachfolgender Reaktion mit Peroxidase-konjugiertem Avidin sichtbar gemacht. Die optimale Verdünnung der Antikörper (Ak) gegen Annexin V, Caspase-3, Caspase-8 und Bcl-2 wurde an gesunden humanen Tonsillen ermittelt. Zum Nachweis von Bcl-2 wurden alle Präparate sowohl mit einem mono- als auch mit einem polyklonalen Antikörper gefärbt. Für die Auswertung wurde das Präparat mit dem überzeugenderen Ergebnis ausgewählt. Im Verlauf der Studie kam es zu Qualitätsproblemen der Caspase-3- und Caspase-8-spezifischen monoklonalen Antikörper, so dass später auch polyklonale Antiseren zum Nachweis dieser Caspasen eingesetzt wurden. Für die Isotyp-Kontrollen wurden gesunde, humane Tonsillen als Kontrollgewebe in Kombination mit einem ersten Antikörper gleicher Subklasse aber fehlender Spezifität für humane Antigene verwendet. Mögliche unspezifische Färbungen durch indirekte Interaktion des 2. Antikörpers wurden durch Negativkontrollen (Färbungen ohne Erstantikörper) erfasst. Unspezifische Bindungsstellen der Präparate wurden durch Inkubation mit Blockierlösung (5% Pferdeserum in PBS) und das in den Präparaten vorhandene Biotin durch Zusatz von Avidin (9% Avidin in Blockierlösung) gesättigt. Die Primärantikörper wurden zusammen mit 9 %igem Biotin in Blockierlösung angeboten.

- | | |
|--|-------------|
| 1. Hemmung der endogenen Peroxidase in 1 %igem H ₂ O ₂ | 20 min |
| 2. Spülen in Aqua dest. | 5 min |
| 3. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit Citratpuffer,
Inkubation in der Mikrowelle (450 W mit jeweils 5 min Pause) | |
| Niere | 3 x 2,5 min |
| Leber | 3 x 6 min |
| 4. Abkühlen | 10 min |

5.	Spülen in PBS Schnitte mit Wachsstift umranden	5 min
6.	Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen und des freien Biotins	20 min
7.	Blockierlösung ablaufen lassen	
8.	Inkubation mit dem Primärantikörper	
9.	Spülen in PBS	2 x 5 min
10.	Inkubation mit dem Biotin-konjugierten Zweitantikörper	45 min
11.	Spülen in PBS	2 x 5 min
12.	Inkubation mit enzymkonjugiertem Avidin/Biotin-Komplex	30 min
13.	Spülen in PBS	2 x 5 min
14.	Inkubation mit DAB	3 min
15.	Spülen in PBS	5 min
16.	Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun	45 sec
17.	Spülen und Bläuen mit Leitungswasser	10 min
18.	Eindecken (Aquatex)	

3.2.3 Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode und Streptavidin-POD-Färbung

Der FragEL DNA Fragmentation Kit (Merck, Darmstadt) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde einzig die Inkubationszeit für Methyl-Grün bei den Nierenpräparaten auf 12 min verlängert. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten humane, gesunde Tonsillen. Während der Markierungsreaktion wurde das Präparat mit Parafilm gegen Austrocknung geschützt und in einer feuchten Kammer inkubiert.

1.	Entparaffinierung mit Xylol	2 x 10 min
2.	Rehydratation in absteigender Alkoholreihe 100% 10 min 96%, 80%, 70% je 5 min	
3.	Kurzes Ausspülen in TBS Schnitte mit Wachsstift umranden	
4.	Permeabilisation mit Protein-Kinase K 1:100 in 10 mM Tris-HCl pH 8	20 min
5.	Kurzes Ausspülen in TBS	
6.	Hemmung der endogenen Peroxidase 30 %iges H ₂ O ₂ 10µl in 90 µl Methanol	5 min
7.	Kurzes Ausspülen in TBS	
8.	Konditionierung (1x Equilibrationspuffer)	20 min

- | | | |
|-----|---|---------------|
| 9. | Markierungsreaktion | |
| | 1:20 in Kit-spezifischem Reaktionspuffer | 2 h bei 37 °C |
| 10. | Kurzes Ausspülen in TBS | |
| 11. | Stoppen der Reaktion (Stopp-Puffer) | 5 min |
| 12. | Kurzes Ausspülen in TBS | |
| 13. | Blockieren unspezifischer Bindungsstellen (Blockierserum) | 10 min |
| 14. | Steptavidin-POD | 30 min |
| 15. | Kurzes Ausspülen in TBS | |
| 16. | DAB Substrat | 15 min |
| 17. | Kurzes Ausspülen in Aqua dest. | |
| 18. | Gegenfärben mit Methyl-Grün | |
| | Niere | 12 min |
| | Leber | 3 min |
| 19. | 100% Alkohol 2-4x eintauchen, wiederholen | |
| 20. | Eintauchen in Xylol und Eindecken mit Entellan | |

3.3 Bildanalyse und Auswertung

3.3.1 Semiquantitative Auswertung

Bei allen Präparaten wurden 4-5 Übersichtsaufnahmen in 12,5-facher Vergrößerung angefertigt. In jeder Aufnahme wurde jeweils eine Region ausgewählt, die in 100-facher Vergrößerung das Präparat gut repräsentierten und Zysten aller Größen bzw. Portalfelder erfassten („regions of interest“, ROI). Diese 4-5 „regions of interest“ eines Präparates wurden zur Dokumentation bzw. räumlichen Einordnung im Präparat zusätzlich in 25-facher Vergrößerung fotografiert.

Bei der Beurteilung der mTOR-Signalkaskade (pAkt, pmTOR und p70S6K) wurde in 100-facher Vergrößerung analog zu einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe lediglich die Färbeintensität berücksichtigt, da hier in den Nierenpräparaten nahezu alle Zysten vollständig gefärbt waren (Fischer, DC *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu ließen sich mit den Ki-67 spezifischen Antikörpern nur sporadisch einige Zellen anfärben, so dass hier bei der semiquantitativen Beurteilung neben der Färbeintensität auch die Zahl der gefärbten Zellen berücksichtigt wurde.

Zur Beurteilung der Apoptose wurden zuerst die Zysten- bzw. Gallengangsepithelien in den Übersichtsaufnahmen betrachtet. Hierbei wurde der relative Anteil gefärbter Zysten N_{Zy} bzw. Gallengänge N_{GG} in den Aufnahmen erfasst und anschließend gemittelt. Dieser gemittelte relative Anteil der positiven Zysten N_{Zy} bzw. Gallengänge N_{GG} wurde bei einem negativen Ergebnis mit 0, bei einem relativen Anteil von weniger als 5% mit 1, zwischen 5 und 50% mit 2, zwischen 50 und 75% mit 3 und bei einem positiven Ergebnis mit einem relativen Anteil von mindestens 75% mit 4 bewertet. Bei 100-facher Vergrößerung wurde registriert, wie viele der Epithelzellen einer Zyste positiv waren. Dieser Quotienten N_Z/N_{Zy} bzw. N_Z/N_{GG} wurden wie N_{Zy} (oben beschrieben) kategorisiert. Die Färbeintensität I wurde ebenfalls bei 100-facher Vergrößerung be-

urteilt und wurde mit den Werten 0 (negativ) bis 4 klassifiziert. Eine schwache Braunfärbung wurde mit 1, eine deutliche Braunfärbung mit 2, eine intensive mit 3 und eine dunkelbraun/schwarze Färbung mit 4 bewertet. Aus den drei ermittelten Parametern wurde die Apoptose anhand eines Scores S beurteilt, der sich als Produkt dieser drei Größen definierte (Pijnenborg, JM *et al.* 2005):

$$S_{Niere} = N_{Zy} * N_Z / N_{Zy} * I$$

$$S_{Leber} = N_{GG} * N_Z / N_{GG} * I$$

Außerdem wurde in allen Färbungen der Leber (auch im Falle der Proliferationsmarker) und in der Niere beim Nachweis fragmentierter DNA (TUNEL Assay) Zellen im Stroma St betrachtet. Hierbei wurde sowohl die Färbeintensität der Stromazellen I_{St} als auch die Anordnung A_{St} der Zellen beurteilt, wobei vereinzelte positive Zellen mit 1 und kumuliert vorkommende positive Zellen mit 2 bewertet wurden. Die Hepatozyten HZ wurden nach Färbeintensität I_{HZ} und dem gemittelten relativen Anteil positiver Hepatozyten, bezogen auf die Zahl der Hepatozyten im gesamten Präparat N_{HZ} entsprechend den oben genannten Kriterien, ebenfalls mit Werten zwischen 0 und 4 beurteilt. In der Niere war die Zystengröße ein weiteres Kriterium und wurde in kleine (ZG_k , 4-9 Epithelzellen), mittlere (ZG_m , 10-100 Epithelzellen) und große (ZG_g , >100 Epithelzellen) unterteilt. Zusätzlich wurde unterschieden, ob Zysten einer Größe separat oder in Kombination mit anderen Größen positiv waren.

3.3.2 Computergestützte Bildanalyse zur Bestimmung der relativen Parenchymfläche in den Präparaten der Zystennieren

Die Fläche des Nierenparenchyms relativ zur gesamten Fläche des Präparates wurde mit dem Programm QWin (Leica, Wetzlar) auf digitalen Fotografien mit HE-gefärbten Präparaten ermittelt. Die Bildgrenzen, innerhalb derer die Differenzierung zwischen Parenchym und Zyste aufgrund der Färbungscharakteristika erfolgte, wurde manuell festgelegt. Die automatische Identifizierung von Zysten und Parenchym wurde in jedem Präparat geprüft und ggf. vor Berechnung der Fläche manuell korrigiert.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Patientenkollektives

Zum Zeitpunkt der Diagnose ARPKD zeigten alle Patienten typische sonografische Befunde in Nieren und Lebern. Die Nieren zeichneten sich durch eine echogene bilaterale Vergrößerung (>2 SDS), eine reduzierte bzw. aufgehobene kortikomedulläre Differenzierung, durch ein „Pfeffer und Salz“-Muster bei Säuglingen und multiple kleine medulläre Zysten bei älteren Kindern aus. Die Ultraschalluntersuchungen der Lebern ergaben bei allen Patienten eine Leberfibrose und bei 15 Patienten ließ sich auch eine Hepatomegalie nachweisen. Die Eltern der erkrankten Kinder waren phänotypisch unauffällig, aus der Familienanamnese ergaben sich keine Hinweise auf eine renale und/oder hepatische Erkrankung und auch die Sonografie zeigte keine pathologischen Befunde. Die individuellen klinischen Daten und genetischen Befunde der Patienten sind im Anhang (*Anhang 1*) wiedergegeben und in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Anthropometrische Charakteristika des Patientenkollektives (n = 16)

		Median	(Min. - Max.)
Alter [Jahre] bei			
Dialysebeginn		2,75	(3 Tage - 14 Jahre)
Nephrektomie		2,75	(11 Tage - 15 Jahre)
Lebertransplantation		9,17	(1,75 Jahre - 15 Jahre)
Körperhöhe bei			
Nephrektomie	[cm]	90	(50 - 154)
	[SDS]	- 2,25	(-3,36 - -0,15)
Lebertransplantation	[cm]	103	(72 - 154)
	[SDS]	- 2,78	(-5,1 - -1,65)

Alle Angaben beziehen sich auf die Verhältnisse bei der ersten Nephrektomie. SDS: standard deviation score.

Bei 10 von 16 Patienten wurde die Diagnose bereits pränatal bzw. bei Geburt und bei vier Patienten in der Neonatalperiode gestellt. Bei einem Patienten ließ sich diese Information retrospektiv nicht mehr erheben. Lediglich bei einem Kind wurde eine ARPKD erst im Alter von 6 Jahren diagnostiziert. Bei dieser Patientin war der Krankheitsverlauf insgesamt offenbar milder, denn sie wurde erst im Alter von knapp 14 Jahren dialysepflichtig und ein Jahr später zeitgleich leber- und nierentransplantiert. Eine portale Hypertension lag bei insgesamt neun Patienten vor. Diese war in vier Fällen mit einer Umkehr des portal-venösen Flusses, in zwei Fällen mit einem Caroli-Syndrom und bei fünf Patienten mit einer histologisch gesicherten Cholangiodysplasie

verbunden. Darüber hinaus konnte eine isolierte Cholangiodysplasie bei einem Patienten diagnostiziert werden. Bei einem weiteren Patienten bestand zumindest der Verdacht auf eine isolierte Cholangiodysplasie.

4.2 Histomorphologische Charakterisierung der erkrankten Nieren und Lebern

Bereits makroskopisch fällt die spinnengewebsartige Morphologie der erkrankten Nieren auf (Abb. 6). Diese Nieren sind durch erweiterte Sammelrohre, die mehrfach dilatierten Tubuli, die großen Zysten und die sporadisch auftretenden Glomeruli charakterisiert. Eine Differenzierung von Mark und Rinde ist unmöglich. In Nieren mit einer hohen relativen Parenchymfläche lassen sich keineswegs häufiger intakte Nephronabschnitte sondern vielmehr eine ausgeprägte interstielle Fibrose nachweisen.

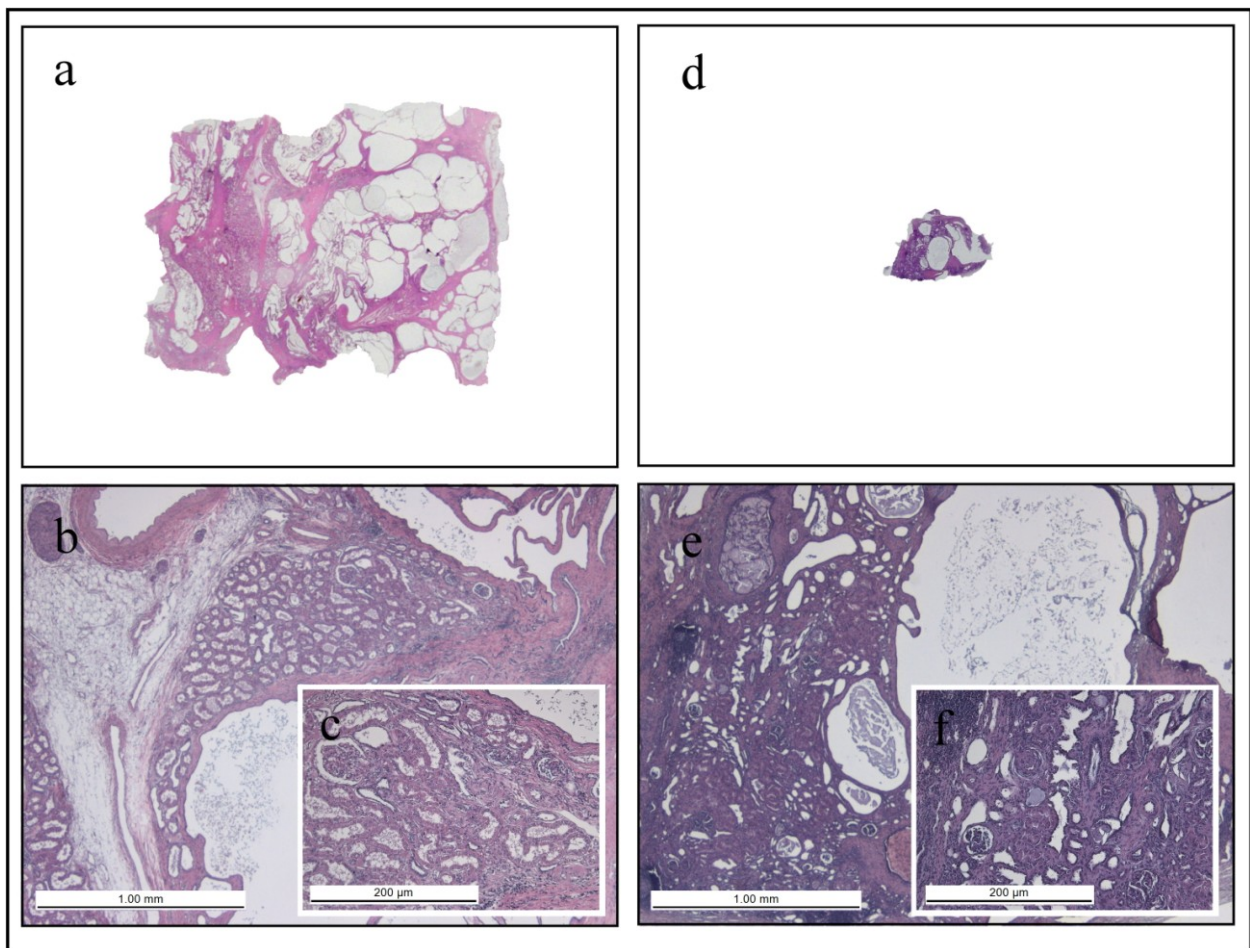


Abb. 6 Repräsentative Gewebeschnitte der Nieren nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HH16 (a, b, c) und HH20 (d, e, f). Makroskopisches Bild ohne Vergrößerung (a, d). Mikroskopisches Bild (b, c, e, f). Vergrößerung: 25x (b, e) und 100x (c, f).

Die auf die Fläche des Gewebes bezogene relative Parenchymfläche reflektiert das Ausmaß der zystischen Veränderungen und beträgt bei den erkrankten Nieren im Median nur 39% (Spannweite 25,9 – 62,3%), im Gegensatz dazu bei den zwei gesunden Niere im Mittel 95,4% (95,0% und 95,8%)(Tab. 3).

Tab. 3 Die auf die Gewebefläche bezogene relative Parenchymfläche

	Parenchymfläche / Präparatefläche [%]
Kontrollen	95,40
HRO2	29,74 / 37,61
H3	35,47
H4	30,12
MS5	43,08 / 45,88
H6	38,30
B9	27,90
H10	25,86
H11	49,81
H12	37,22
H13	39,65
HH16	46,20
Pr17	43,71
HRO19	54,49
HH20	62,25
Median	38,98
Spannweite	25,86 - 62,25

Von den Patienten HRO2 und MS5 (zweizeitige Nephrektomien) wurden die Daten beider Nieren übernommen.

Die Lebern der ARPKD-Patienten sind histologisch durch erweiterte, proliferierte Ductuli biliferi und eine portale Fibrose gekennzeichnet. Letztere geht mit einer Verbreiterung der Portalfelder und Septenbildungen einher, die zu einer Einmauerung der Hepatozyten führt. Eine Gliederung in Zentralvenenläppchen ist noch zu erkennen. Zudem finden sich in den Bindegewebszügen meist in Haufen gruppierte Zellen (*Abb. 7*).

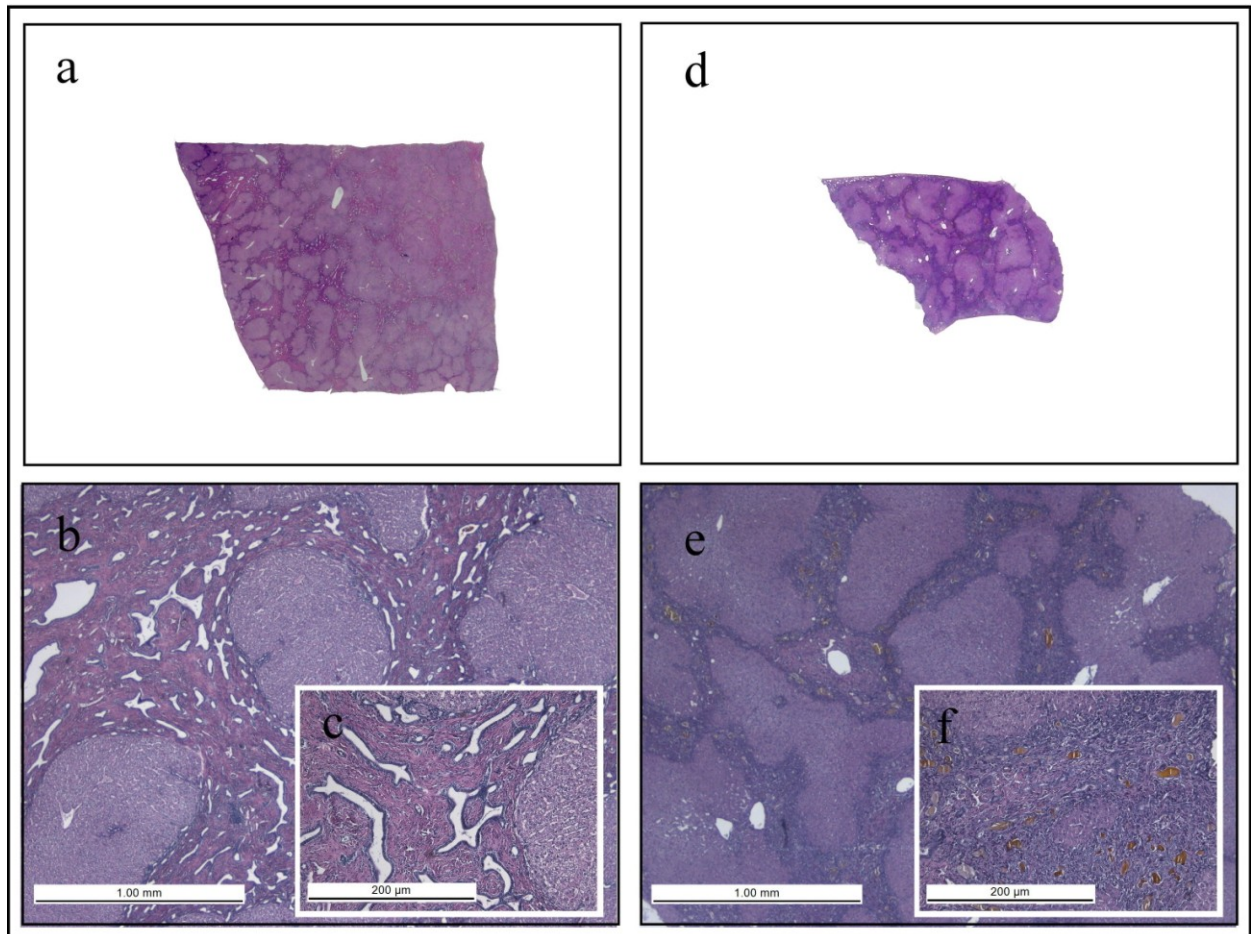


Abb. 7 Repräsentative Gewebeschnitte der Lebern nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung
 HH10 (a, b, c) und HH20 (d, e, f). Makroskopisches Bild ohne Vergrößerung (a, d). Mikroskopisches Bild (b, c, e, f). Vergrößerung: 25x (b, e) und 100x (c, f).

4.3 Immunhistochemische Analyse von Nieren und Lebern

Für die Beurteilung der Färbungen mit Antikörpern gegen Ki-67, pAkt, mTOR und pS6K standen jeweils 17 Nierenpräparate von 15 Patienten und 7 Leberpräparate von 7 Patienten zur Verfügung. Für die Analyse der Apoptosemarker standen nicht in allen Fällen die gleichen Präparatezahlen bereit (Tab. 4).

Tab. 4 Übersicht über die Anzahl der Präparate und Patienten, die für die Untersuchung der Apoptosemarker zur Verfügung standen

Nachweis von	Nieren		Lebern	
	Anzahl der Präparate	Anzahl der Patienten	Anzahl der Präparate	Anzahl der Patienten
Annexin V	13	12	7	7
Caspase-3	15	14	7	7
Caspase-8	15	13	6	6
Bcl-2	16	14	7	7
fragm. DNA	16	14	7	7

4.3.1 Expression des Proliferationsmarkers Ki-67

In 11 von 17 Nieren finden sich Ki-67-positive Zellen, die typischerweise vereinzelt innerhalb des Zystenepithels lokalisiert sind. In vier dieser Ki-67-positiven Nieren sind die gefärbten Zellen gleichmäßig, in sieben Nieren sporadisch verteilt. In drei von sieben Lebern konnten Ki-67-positive Zellen im Gallengangsepithel identifiziert werden. Es fiel allerdings auch auf, dass in fünf der sieben Leberpräparate Ki-67 in den Stromazellen nachweisbar ist. In zwei Lebern sind die Hepatozyten deutlich angefärbt. Weder in gesunder Leber noch in gesunder Niere können Ki-67 nachgewiesen werden (Abb. 8 und Tab. 5).

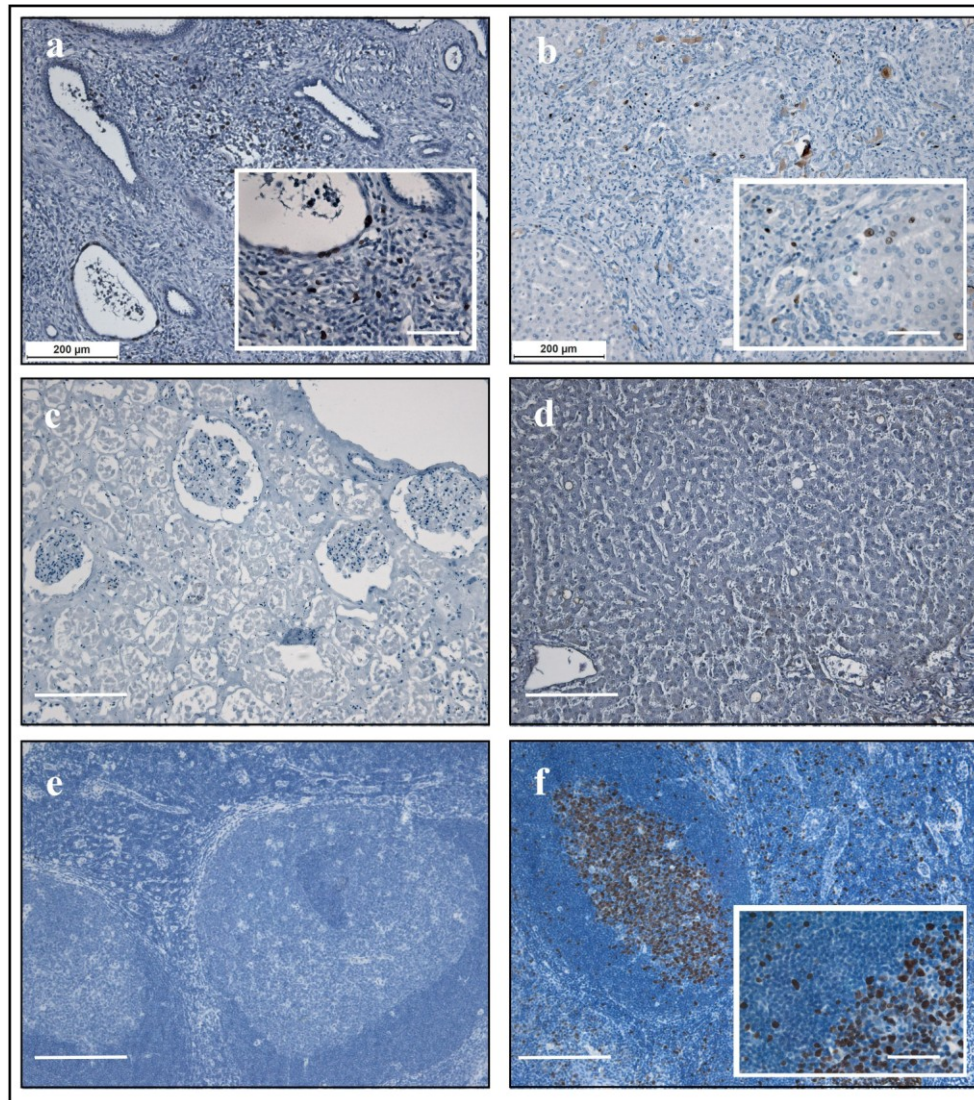


Abb. 8 Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

4.3.2 Analyse der Akt-mTOR-Signalkaskade: Nachweis von pAkt, pmTOR und pS6K

In allen Nieren kann phosphoryliertes Akt detektiert werden. Typischerweise färbt sich das gesamte Epithel einer positiven Zyste intensiv an; nur drei von 17 Nieren sind schwach gefärbt. Demgegenüber lässt sich pAkt nur in einem Leberpräparat eindeutig nachweisen. In diesem Präparat sind positive Gallengangsepithelien einzig in einem relativ eng umschriebenen Bereich zu erkennen, zusätzlich finden sich hier vereinzelt schwach positive Stromazellen. In der gesunden Niere bzw. Leber ist kein aktiviertes Akt nachweisbar (*Abb. 9*).

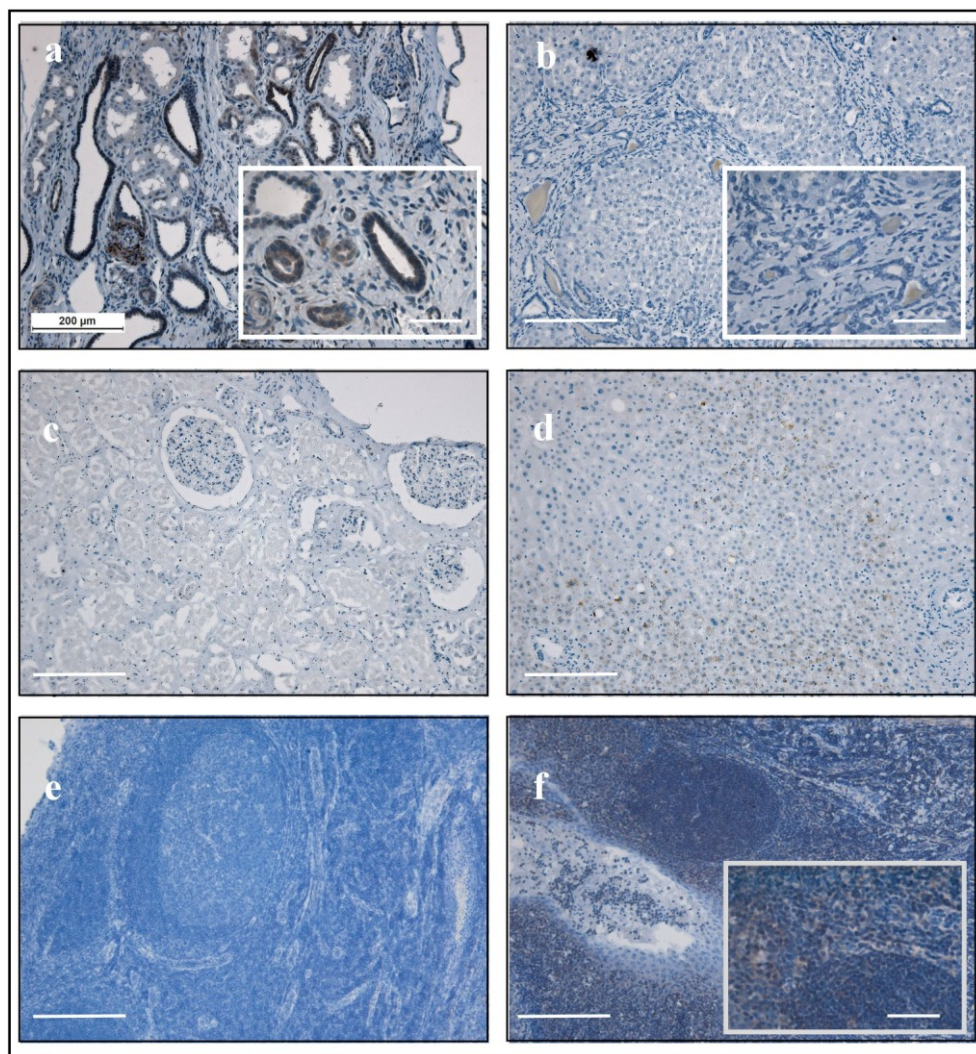


Abb. 9 Immunhistochemischer Nachweis von pAkt

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

Aktiviertes und an Ser2448 phosphoryliertes mTOR ist im Epithel aller Nieren und Lebern der ARPKD-Patienten nachweisbar. Die Intensität der Färbung ist in beiden Geweben vergleichbar, lediglich fünf von 18 Nieren und zwei von sieben Lebern färben sich schwächer. In einem Leberpräparat kann pmTOR zusätzlich auch in den Hepatozyten nachgewiesen werden. Die Stromazellen sind in allen Präparaten negativ. In den Sammelrohren der gesunden Niere lässt sich pmTOR mit moderater Färbeintensität nachweisen, während diese Färbung in gesunder Leber eindeutig negativ ist (*Abb. 10*).

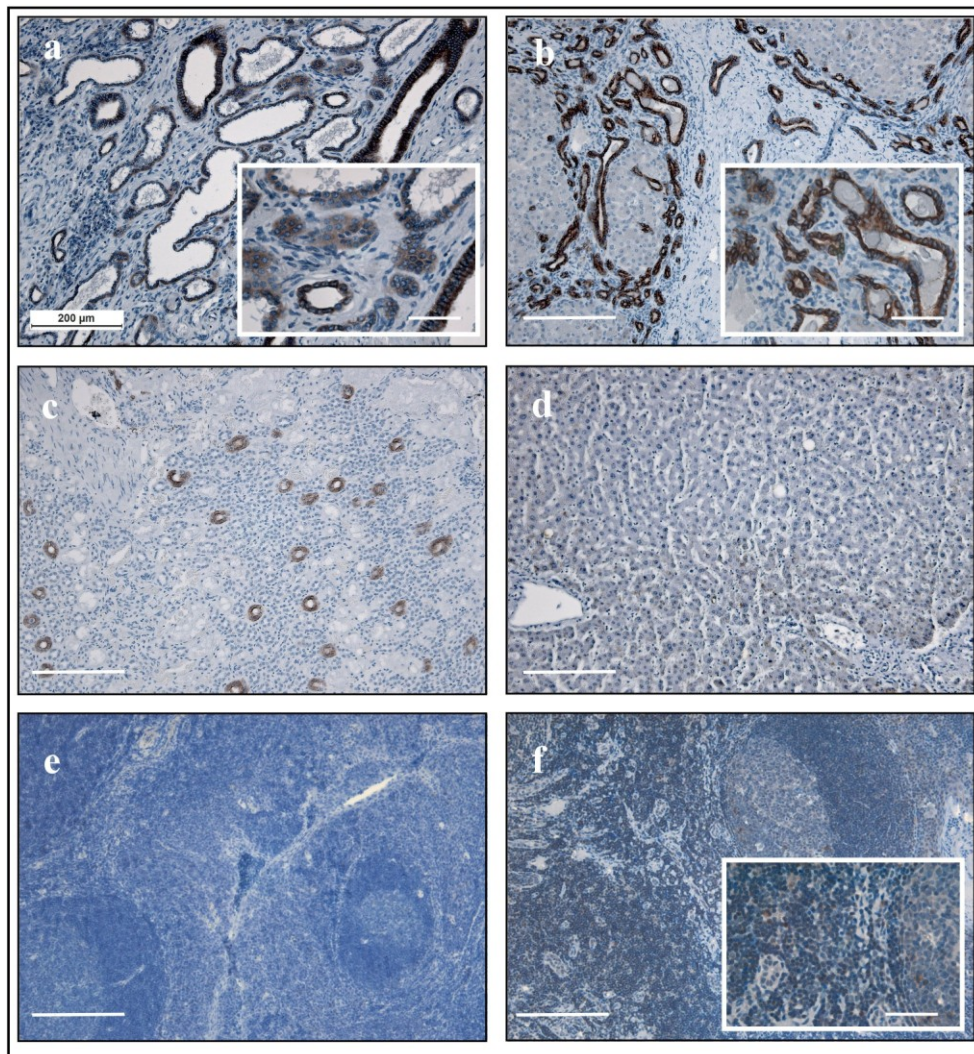


Abb. 10 Immunhistochemischer Nachweis von pmTOR

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

In 16 von 17 Nieren zeigen sich pS6K-positive Zysten, wobei pS6K bevorzugt im apikalen Pol der Epithelzellen akkumuliert. In der gesunden Niere können schwach positive Signale im Zylinderepithel detektiert werden, wobei dieses positive Epithel weder einem Tubulus noch einem Sammelrohr zuzuordnen ist. In einem von sieben Leberpräparaten ist pS6K in den Gallengangsepithelien, in drei Präparaten in den Hepatozyten und in zwei dieser Präparate zudem noch in den Bindegewebszellen nachweisbar. In der gesunden Leber lässt sich pS6K weder im Gallengangsepithel noch in den Hepatozyten oder in den Stromazellen nachweisen (Abb. 11).

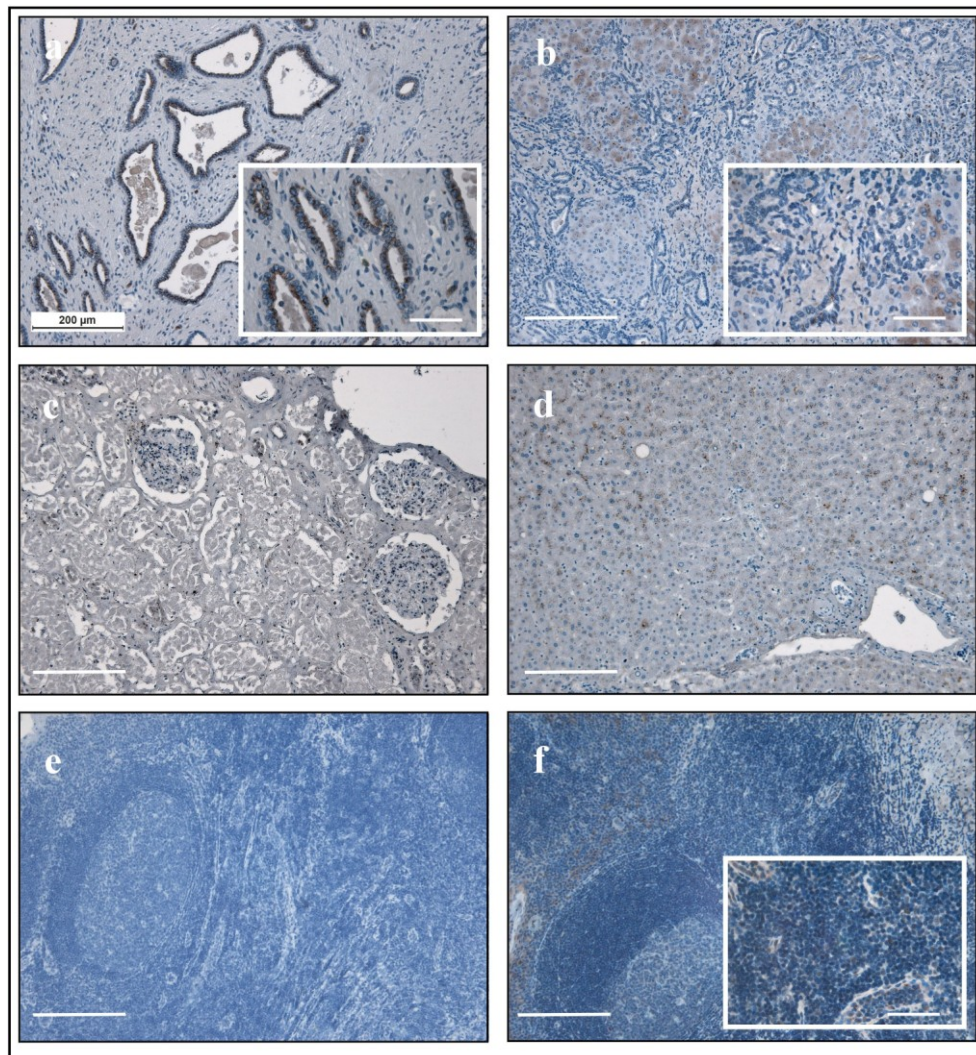


Abb. 11 Immunhistochemischer Nachweis von pS6K

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

In den Nieren der ARPKD-Patienten sind die Nachweise von pAkt, pmTOR und pS6K eindeutig auf das Zystenepithel beschränkt und weitestgehend unabhängig von der Zystengröße. Der relative Anteil der positiven Epithelzellen nimmt von pAkt über pmTOR zu pS6K hin ab. In der gesunden Kontrolle zeigen sich wenige pmTOR-positive Sammelrohre und pS6K-positive Tubuli bzw. Sammelrohre, während die pAkt spezifischen Färbungen durchgängig negativ sind. In den Lebern der ARPKD-Patienten ist nur pmTOR deutlich nachzuweisen. Die gesunde Leber zeigt keine Aktivität der Akt-mTOR-Signalkaskade (Tab. 5; Abb. 9-11).

Tab. 5 Individuelle Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchungen zur Aktivierung der Akt-mTOR-Signalkaskade und der Expression von Ki-67

	Nachweis von							
	pAkt		pmTOR		pS6K		Ki-67	
	N	L	N	L	N	L	N	L
Kontrolle	-	-	++	-	(+)	-	-	-
H4*	+	(+)	++(+)	++	++	-	-	+
H7*	+++	-	+++	+++	+++	+	-	-
HH10*	+++	-	++	+	++	-	++	-
H11*	++(+)	-	++(+)	+	+++	-	++	(+)
HH14	k.M.	(+)	k.M.	+++	k.M.	-	k.M.	-
HH16	++(+)	-	++(+)	+++	++	-	++	(+)
HH20	++	+	+++	++(+)	++(+)	-	-	-
HRO2a*	++		++		++		+	
HRO2b*	++		++		++		+	
H3*	(+)		(+)		+++		(+)	
MS5a*	++		+		++		-	
MS5b*	+++		+		++		(+)	
H6*	+++		++(+)		+++		+	
B9*	+++		++(+)		(+)		+	
H12*	++		+++		++		(+)	
H13*	++(+)		+++		++		-	
Pr17	++(+)		+		-		-	
HRO19	+++		+		+		++	

* Die Daten der Nierenpräparate sind aus (Fischer, DC *et al.* 2009) übernommen, k.M.: kein Material.

In *Abbildung 12* sind die Färbungen der Akt-mTOR-Signalkaskade und die Expression Ki-67 exemplarisch an korrespondierenden Nieren- und Leberschnitten eines Patienten dargestellt, der

im Alter von 6,25 Jahren eine kombinierte Nieren-/Lebertransplantation erhielt. Auch hier zeigen sich in der Niere positive Signale für die Akt-mTOR-Signalkaskade, während in der Leber lediglich pmTOR eindeutig nachweisbar ist.

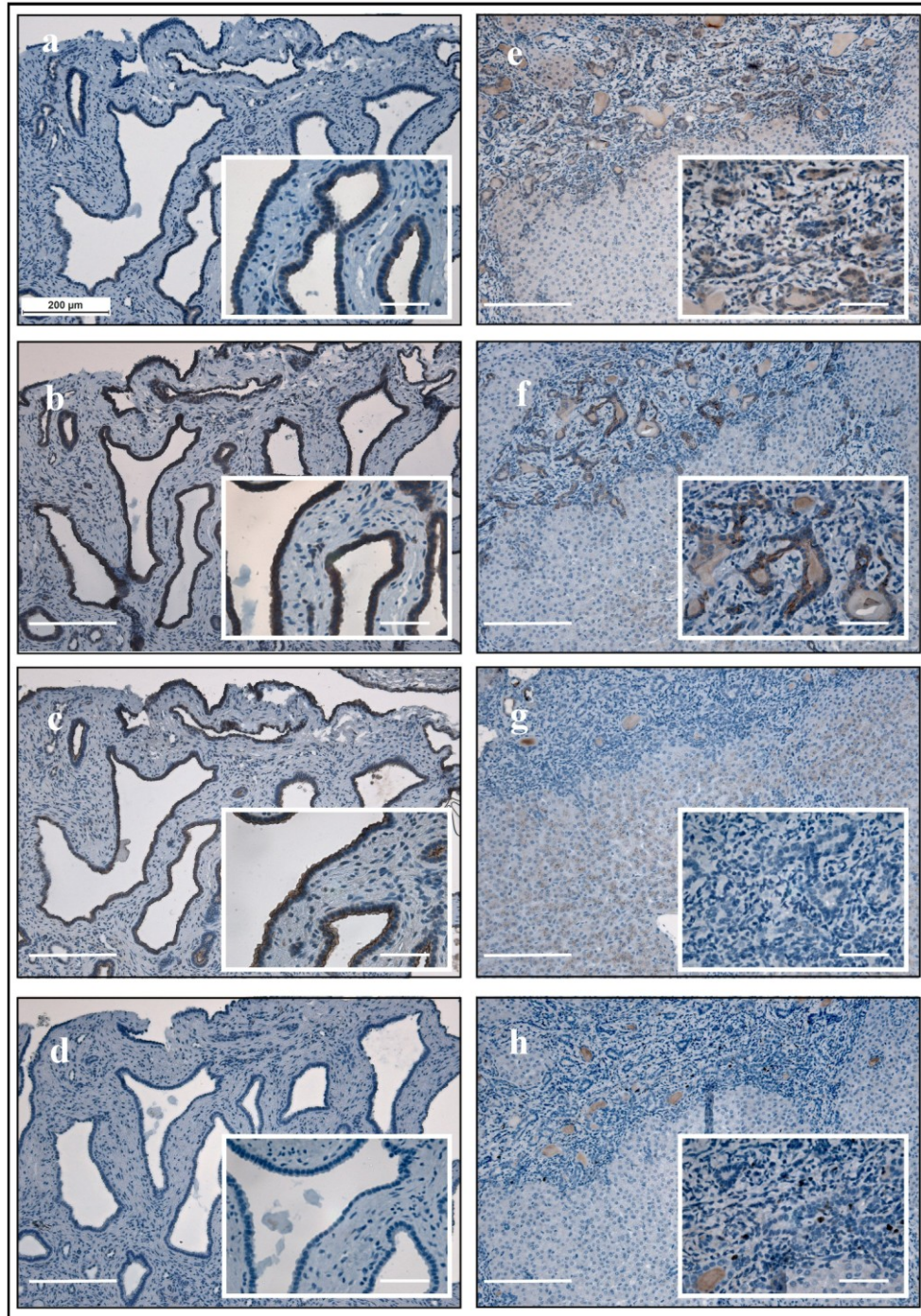


Abb. 12 Gegenüberstellung von pAkt, pmTOR, pS6K und Ki-67 in Niere und Leber eines Patienten

Niere (a-d) und Leber (e-h) des Patienten HH20 (Organe wurden zeitgleich entnommen). pAkt (a, e), pmTOR (b, f), p70S6 (c, g), Ki-67 (d, h). Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

4.3.3. Nachweis von Markern der Apoptose und des antiapoptotischen Faktors Bcl-2

In den Nieren- und Leberpräparaten wurden Caspase-8 als Marker des extrinsischen Signalweges, Annexin V als Marker der frühen Apoptose, Caspase 3 und fragmentierte DNA als Marker der fortgeschrittenen Apoptose und Bcl-2 als antiapoptotischer Marker untersucht.

4.3.3.1 Nachweis von Caspase-8 als Marker des extrinsischen Signalweges

In 14 Nierenpräparaten kann Caspase-8 detektiert werden. Diese Protease ist bevorzugt in mittelgroßen, aber nie in großen Zysten nachweisbar (*Abb. 13*).

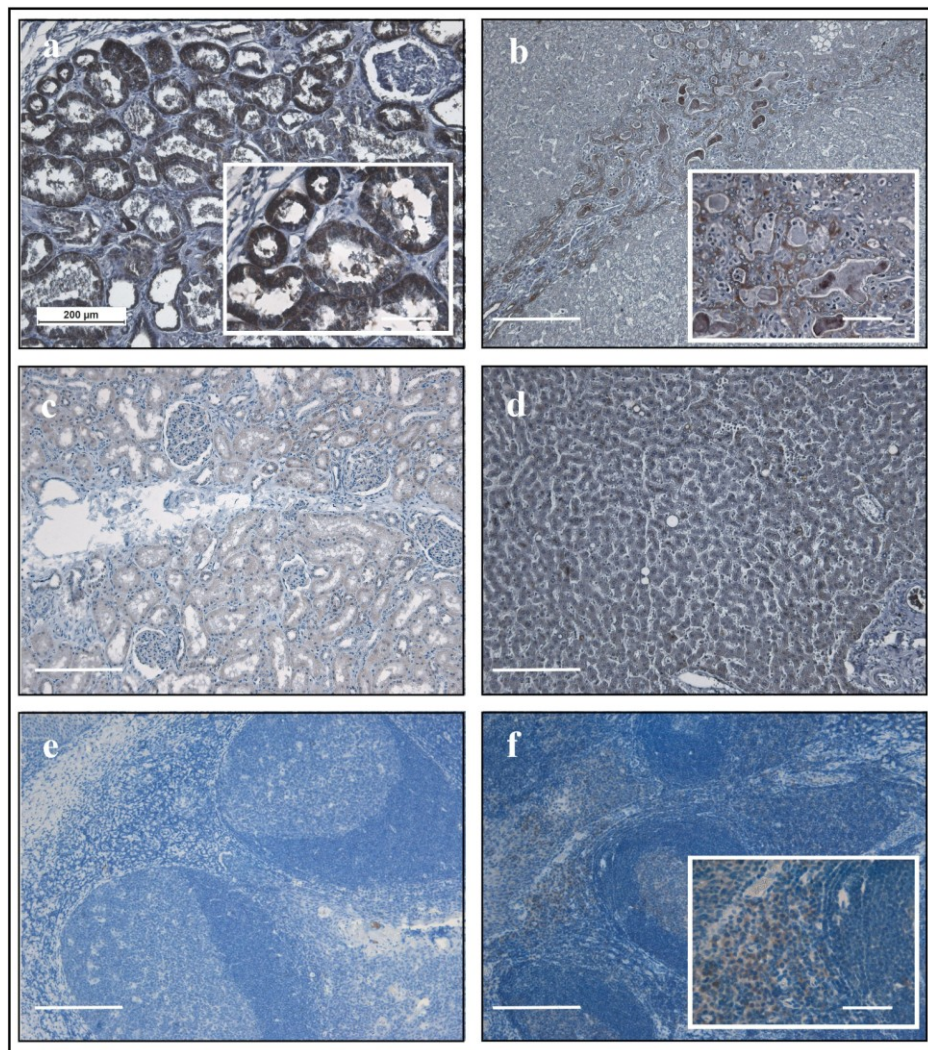


Abb. 13 Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-8

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerungen).

In 10 der positiven Präparate sind mindestens 75% des Epithels einer Zyste angefärbt. Allerdings sind bei insgesamt sieben von 15 Präparaten und damit auch bei fünf der oben beschriebenen 10 Präparate weniger als 5% der Zysten positiv. Die gesunde Niere zeigt einzelne, leicht positive distale Tubuli. In vier von sechs Leberpräparaten lässt sich Caspase-8 in den Gallengängen nachweisen. In drei der positiven Präparate sind nahezu alle Gallengänge und das gesamte Gallengangsepithel angefärbt. In drei von sechs Lebern finden sich zudem im verbreiterten Portalfeld vereinzelt stark positive Stromazellen, in zwei Präparaten sind mehr als die Hälfte der Hepatozyten schwach angefärbt. In der gesunden Leber finden sich keine signifikanten Färbungen (Abb. 13).

4.3.3.2 Nachweis von Annexin V als Marker der frühen Apoptose

Für die Analyse dieses Markers standen 13 von 17 Nierenpräparaten sowie 7 Leberpräparate zur Verfügung (Tab. 4, S. 24). In 12 von 13 Nierenpräparaten ist Annexin V weitestgehend unabhängig von der Größe der Zysten nachweisbar. Die positiven Zellen haben meist eine hohe Färbintensität und entsprechen mehr als der Hälfte aller Zellen innerhalb des Zystenepithels. Zudem zeigt sich, dass zwischen dem Score der Annexin V- Färbung und der relativen Parenchymfläche kein Zusammenhang besteht (Abb. 14).

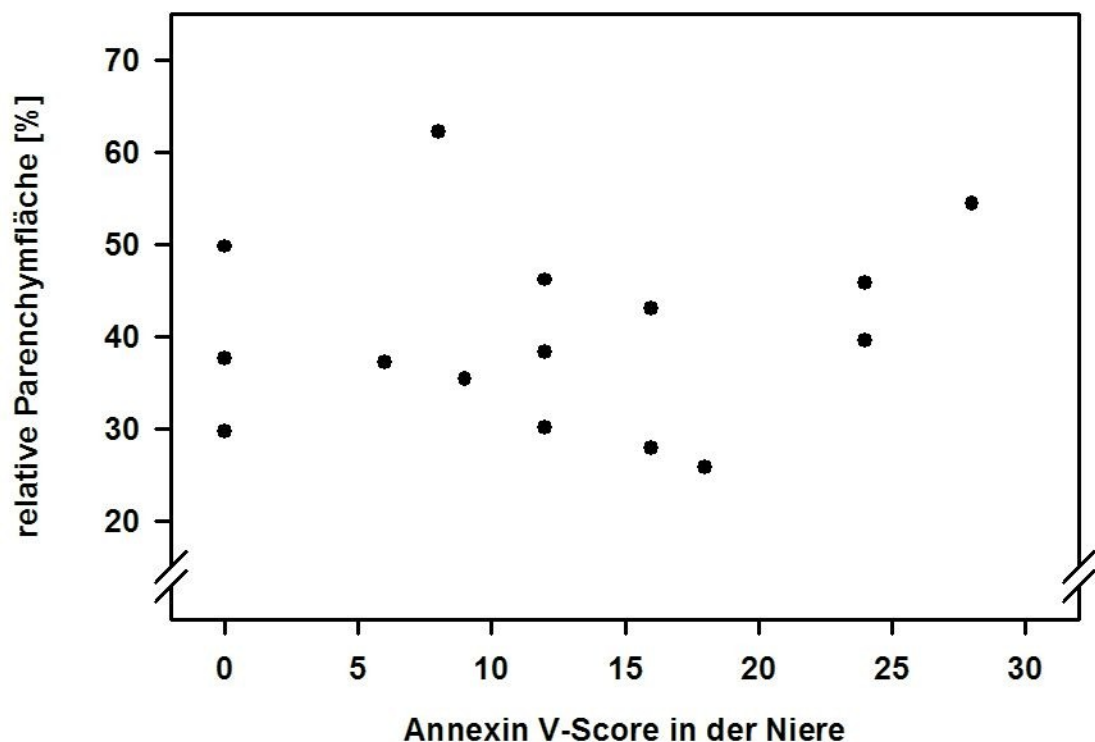


Abb. 14 Die auf die Gewebefläche bezogene Parenchymfläche in Relation zum Annexin V-Score in Nieren von ARPKD Patienten

In der gesunden Niere finden sich vereinzelt deutlich positive Sammelrohre. In der Leber lässt sich Annexin V in den erweiterten Ductuli nachweisen. Dabei sind in fünf der sieben Präparate die gesamten Gallengänge intensiv gefärbt. Nur ein Präparat weist positive Stromazellen und Hepatozyten auf. In gesunder Leber zeigen sich einige positive Hepatozyten, aber keine Anfärbung des Gallengangsepithels (*Abb. 15*).

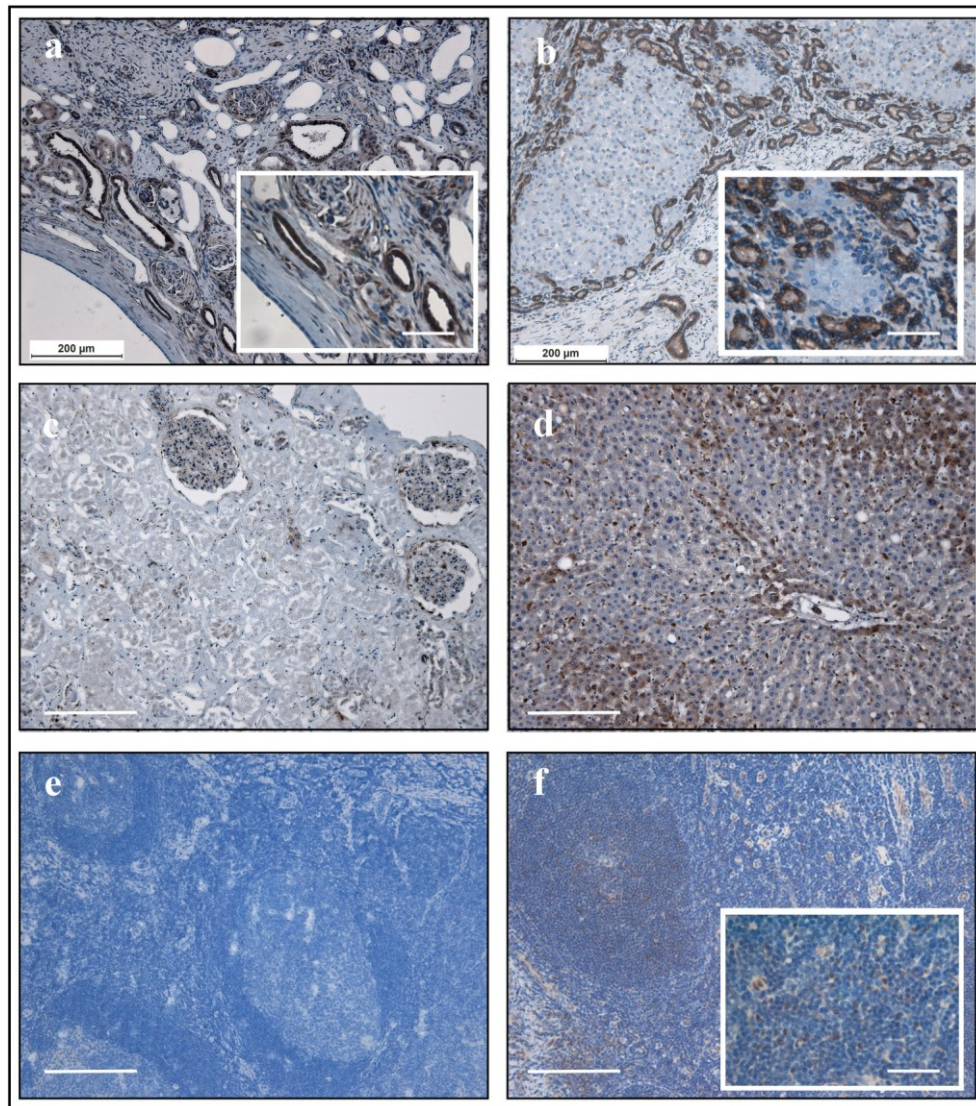


Abb. 15 Immunhistochemischer Nachweis von Annexin V

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

4.3.3.3 Nachweis von Caspase-3 und fragmentierter DNA als Marker der fortgeschrittenen Apoptose

Nur in sechs von 16 Nierenpräparaten lassen sich mit dem gegen Caspase-3 gerichteten Antikörper einige, vorwiegend mittelgroße, Zysten schwach, dann aber vollständig, anfärben. Die Gallengangsepithelien der Lebern der ARPKD-Patienten sind ausnahmslos negativ. Zwei der sieben Lebern zeigen vereinzelt positive Stromazellen. Die gesunden Kontrollen weisen keine aktivierte Caspase-3 auf (*Abb. 16*).

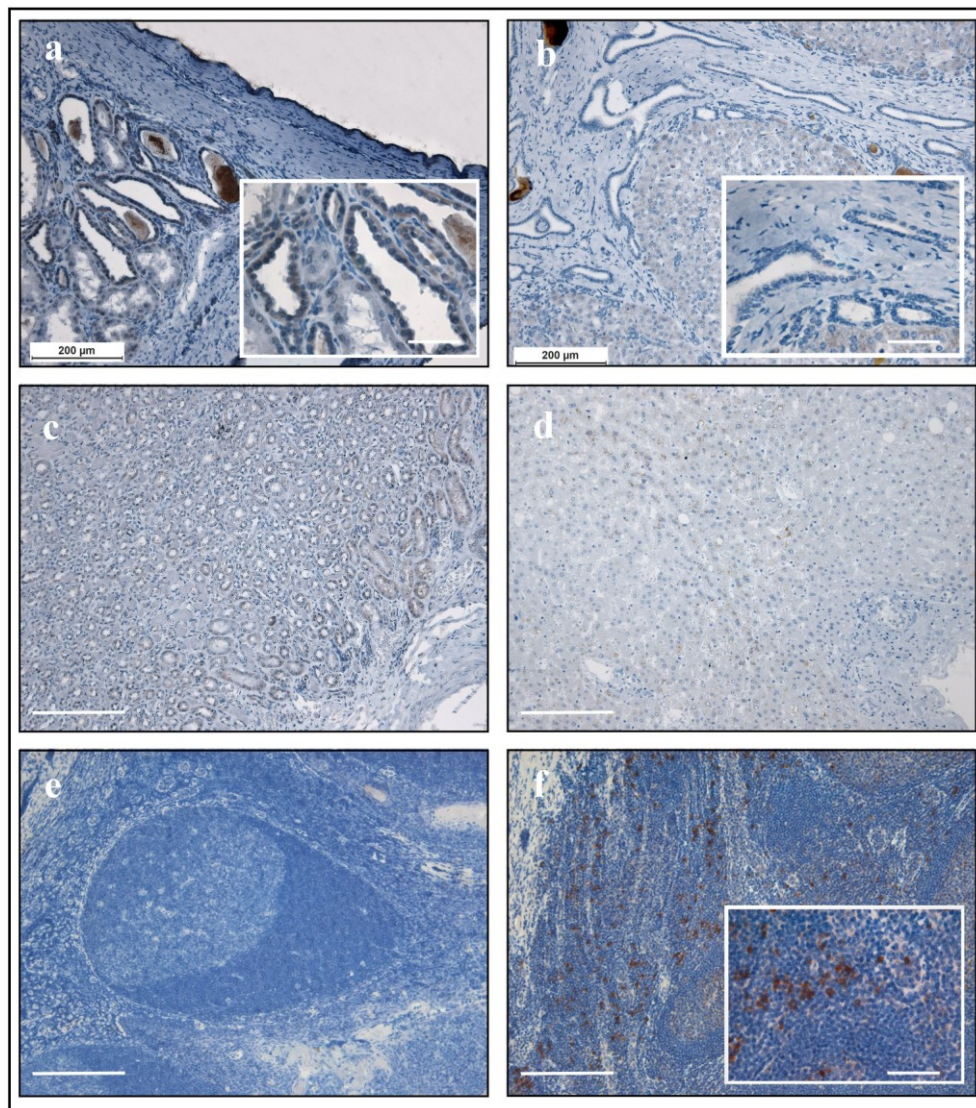


Abb. 16 Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c), und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

Fragmentierte DNA ist in den erkrankten Nieren vereinzelt und sowohl im Epithel in 10 der 16 Präparate als auch im Bindegewebe in 11 der 16 Präparate nachweisbar. Charakteristisch ist, dass sich vor allem die großen Zysten anfärben. In der gesunden Niere finden sich vereinzelt deutlich positive Zellen in den distalen Tubuli und Sammelrohren. Nur in einer der erkrankten Lebern ist fragmentierte DNA in den Gallengängen nachweisbar, jedoch finden sich in insgesamt sechs Präparaten sowohl positive Stromazellen als auch positive Hepatozyten. Die gesunde Leber zeigt viele intensiv gefärbte Hepatozyten (*Abb. 17*).

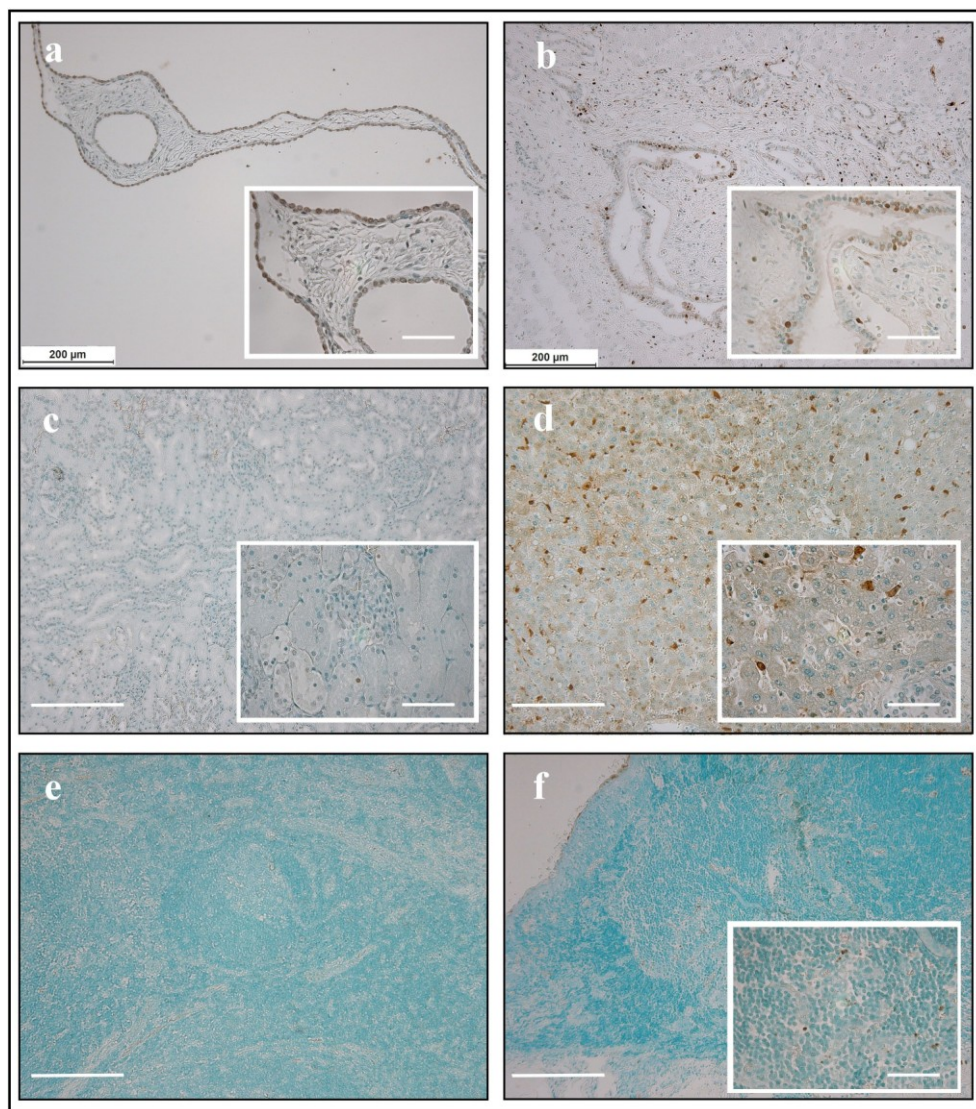


Abb. 17 Immunhistochemischer Nachweis von fragmentierter DNA

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c), und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

4.3.3.4 Aktivität des antiapoptotischen Faktors Bcl-2

In 15 der 16 Nierenpräparate ist Bcl-2 nachweisbar. Die positiven Zellen befinden sich vor allem in den mittelgroßen Zysten, dabei sind in 13 Präparaten mehr als 50% der Zellen einer Zyste angefärbt. Für Bcl-2 zeigt sich eine Assoziation zwischen dem errechnetem Score und der auf den Gewebeschnitt bezogenen relativen Parenchymfläche (*Abb. 18*). Die gesunde Niere zeigt speziell in den Sammelrohren moderat gefärbte Zylinderepithelien. In sechs von sieben Lebern kann Bcl-2 in den Gallengängen detektiert werden, wobei sich in vier Präparaten mehr als 75% der Zellen eines Gallenganges anfärben. Die Hepatozyten sind in zwei Präparaten intensiv angefärbt. In fünf Präparaten sind die in Haufen vorkommenden intensiv gefärbten Stromazellen auffällig. In der gesunden Leber lässt sich kein Bcl-2 nachweisen (*Abb. 19*).

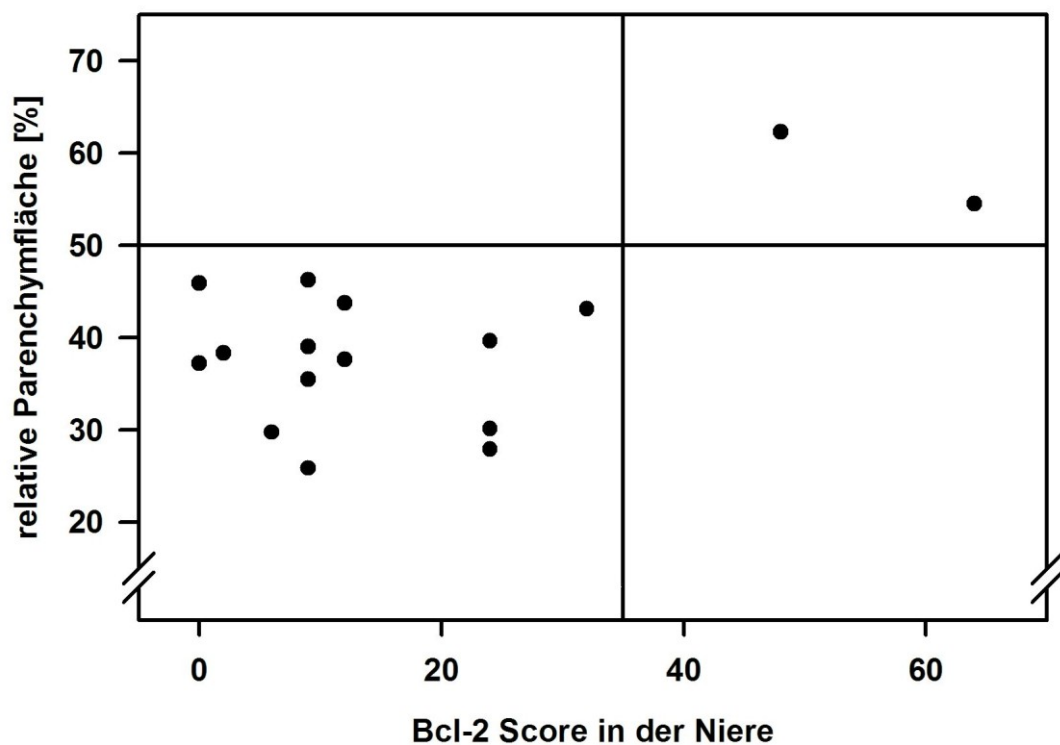


Abb. 18 Die auf die Gewebefläche bezogene Parenchymfläche in Relation zum Bcl-2-Score

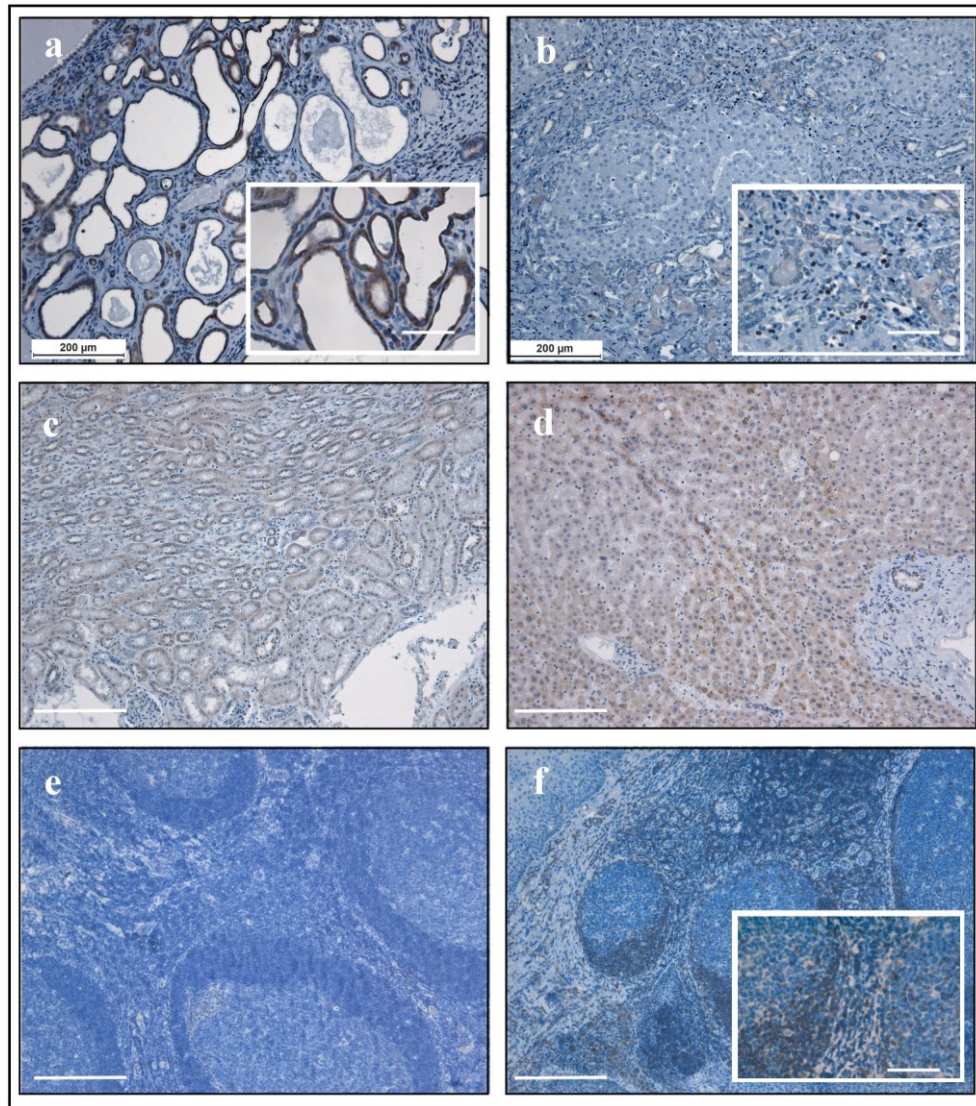


Abb. 19 Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-2

Färbungen einer erkrankten Niere (a), einer erkrankten Leber (b), einer gesunden Niere (c) und einer gesunden Leber (d). Die Isotypenkontrolle (Tonsille, e) und die positive Kontrolle (Tonsille, f) sind ebenfalls dargestellt. Vergrößerung: 100x und 400x (Ausschnittvergrößerung).

4.3.3.5 Zusammenfassende Beurteilung der Apoptosemarker

In den erkrankten Nieren sind Caspase-8, Annexin V und Bcl-2 deutlich in den Zystenepithelien nachzuweisen. Fragmentierte DNA findet sich hingegen nur sporadisch im Zystenepithel und im Stroma. Die Färbungen von Caspase-3 zeigen meist ein negatives Ergebnis (Tab. 6).

Tab. 6 Individuelle Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchung (Score) der Nieren von ARPKD-Patienten zum extrinsischen Signalweg (Caspase-8), zur frühen (Annexin V) bzw. fortgeschrittenen Apoptose (Caspase-3, fragmentierte DNA) und Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2

	Nachweis von				
	Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2
Kontrolle	4	9	0	2	16
HRO2a	6	k.M.	k.M.	0	6
HRO2b	4	k.M.	12	0	12
H3	k.M.	9	0	2	9
H4	18	12	6	4	24
MS5a	4	16	0	0	32
MS5b	24	24	4	0	2
H6	36	12	0	3	6
B9	8	16	0	3	24
H10	6	18	0	3	9
H11	32	0	0	2	12
H12	0	6	0	2	0
H13	12	24	3	3	24
HH16	36	12	0	0	9
Pr17	12	k.M.	8	2	12
HRO19	48	48	0	3	64
HH20	48	8	4	0	48
Median	12	12	0	2	12
Spannweite	0 - 48	0 - 48	0 - 12	0 - 4	0 - 64

k.M.: kein Material.

Es zeigt sich, dass Annexin V und Caspase-8 bevorzugt in kleinen und mittelgroßen Zysten nachweisbar ist, dass Bcl-2 bevorzugt in mittelgroßen Zysten detektierbar ist und dass fragmentierte DNA im Wesentlichen in den großen Zysten vorkommt (*Abb. 20*).

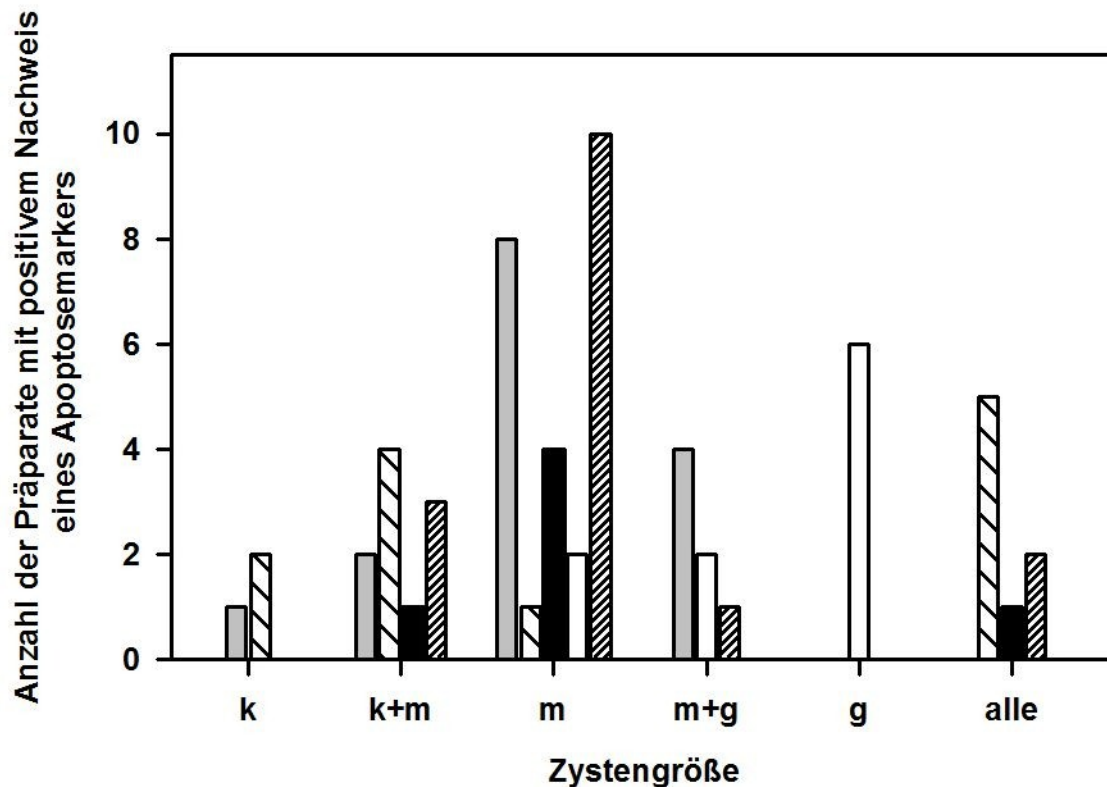


Abb. 20 Beziehung zwischen der Zystengröße und den Apoptosemarkern

k: kleine Zysten, m: mittelgroße Zysten, g: große Zysten, grauer Balken: Caspase-8; grob schraffierter Balken: Annexin V, schwarzer Balken: Caspase-3, fein schraffierter Balken: Bcl-2, weißer Balken: fragmentierte DNA.

In der gesunden Niere lassen sich Annexin V sowie Bcl-2 in den Sammelrohren und Caspase-8 in den distalen Tubuli nachweisen, während Caspase-3 nicht nachweisbar ist. Fragmentierte DNA kommt in den gesunden Nieren sporadisch sowohl in den Sammelrohren als auch in den distalen Tubuli vor.

In den erkrankten Lebern können Caspase-8, Annexin V und Bcl-2 in den Gallengängen nachgewiesen werden, wohingegen sich Caspase-3 und fragmentierte DNA nicht in den Gallengängen darstellen lassen. Zusätzlich finden sich in den Stromazellen sowohl Bcl-2 als auch fragmentierte DNA. In der gesunden Leber lassen sich Annexin V und fragmentierte DNA vereinzelt in den Hepatozyten nachweisen. Die immunhistochemischen Ergebnisse werden in *Tabelle 7* gegenübergestellt, in *Abb. 21* sind diese Färbungen exemplarisch an korrespondierenden Nieren-

und Leberschnitten eines Patienten dargestellt. Eine tabellarische Übersicht über die individuellen Befunde der Nieren- und Leberpräparate findet sich im Anhang (Niere, *Anhang 2*; Leber, *Anhang 3*).

Tab. 7 Individuelle Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchung (Score) der Lebern und korrespondierender Nieren von ARPKD-Patienten zum extrinsischen Signalweg (Caspase-8), zur frühen (Annexin V) bzw. fortgeschrittenen Apoptose (Caspase-3, fragmentierte DNA) und Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2

	Nachweis von									
	Caspase-8		Annexin V		Caspase-3		fragm. DNA		Bcl-2	
	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L
Kontrolle	4	0	9	0	0	0	2	0	16	0
H4	18	18	12	32	6	0	4	0	24	32
HH10	6	32	18	32	0	0	3	0	9	12
H11	32	k. M.	0	24	0	0	2	6	12	0
HH16	36	0	12	48	0	0	0	0	9	16
HH20	48	32	8	48	4	0	0	0	48	3
H7		0		16		0		0		12
HH14		9		48		0		0		3
Median	32	25	12	32	0	0	2	0	12	14
Spannweite	6 - 48	0 - 32	0 - 18	24 - 48	0 - 6	0	0 - 4	0 - 6	9 - 48	0 - 32

Der Median und die Spannweite beziehen sich nur auf gepaarte Nieren- und Leberpräparate.
k.M.: kein Material.

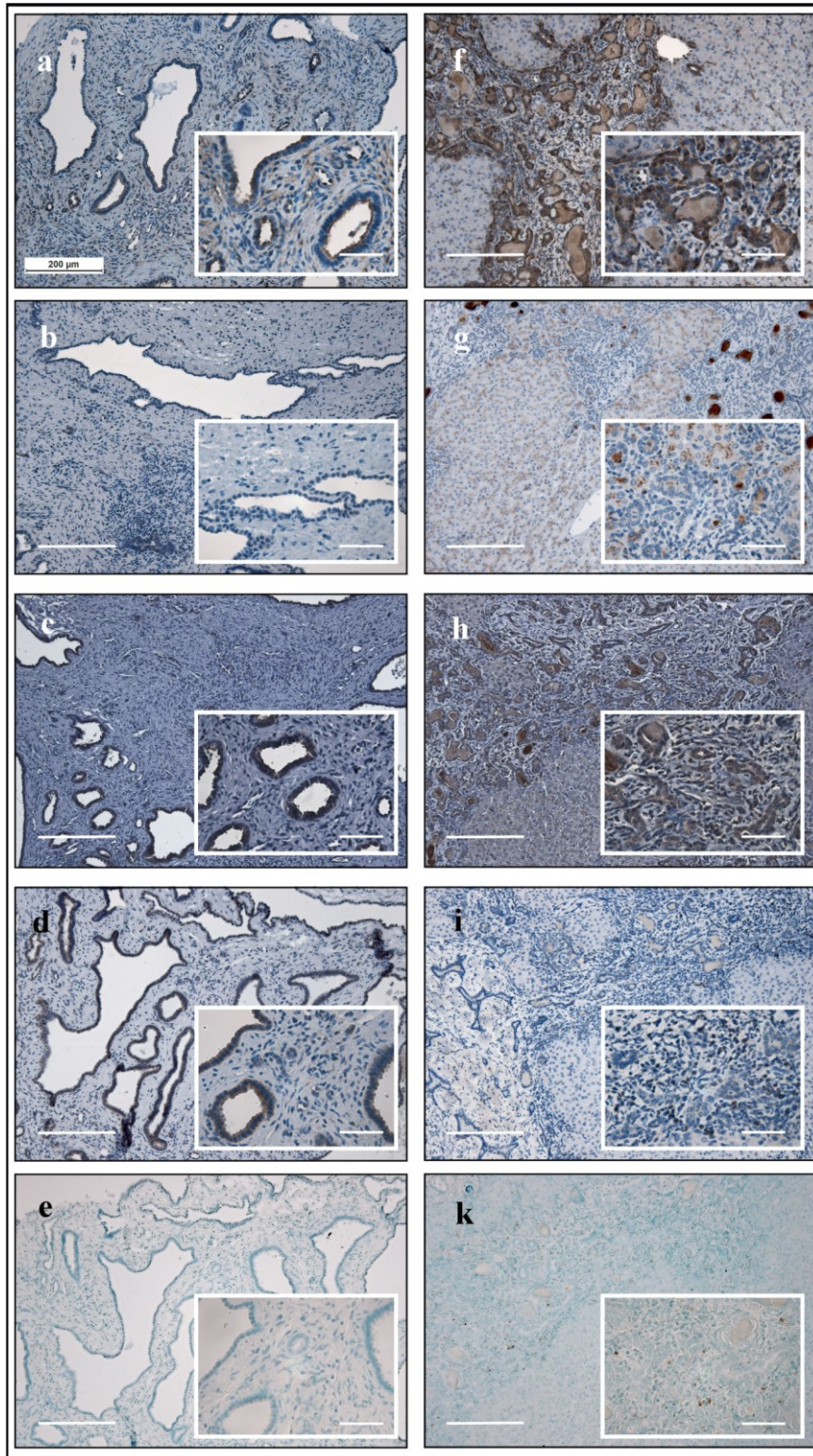


Abb. 21 Gegenüberstellung von Annexin V, aktivierter Caspase-3, aktivierter Caspase-8, Bcl-2 und fragmentierter DNA an Niere und Leber eines Patienten

Niere (a-e) und Leber (f-k) des Patienten HH20 (Organe wurden zeitgleich entnommen) Annexin V (a, f), Caspase-3 (b, g), Caspase-8 (c, h), Bcl-2 (d, i), fragmentierte DNA (e, k). Vergrößerung: 100x und 1:400x (Ausschnittsvergrößerung).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die klinischen Daten von ARPKD-Patienten erfasst und sowohl zu den morphologischen als auch immunhistochemischen Befunden, die an archiviertem Nieren- und/oder Lebergewebe dieser Patienten erhoben wurden, in Beziehung gesetzt. Dabei standen die Verteilung und Lokalisation proliferierender sowie apoptotischer Zellen in den betroffenen Organen im Mittelpunkt.

5.1 Charakterisierung des Patientenkollektives

Das sporadische Auftreten der Zystennieren im Familienstammbaum und die phänotypisch unauffälligen Eltern sind charakteristisch für einen rezessiv autosomalen Erbgang. Mit nur einer Ausnahme wurde bei allen in dieser Arbeit untersuchten Patienten eine Nierentransplantation durchgeführt und 7 Patienten erhielten parallel oder zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls eine Lebertransplantation. Die klinischen Daten dieser und anderer Studien sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8 Übersicht publizierter klinischer Daten von ARPKD-Patienten

	eigene Arbeit	Dias et al. (2010)	Bergmann et al. (2005)	Guay- Woodford und Desmond (2003)	Capisonda et al. (2003)	Zerres et al. (1996)
Patienten (m/w)	16 (9/7)	25 (12/13)	186 (97/89)	166 (84/82)	31 (14/17)	115 (66/49)
Pränatale Diagnosen	63%	20%	23%	46%	32%	10%
Kleinwuchs	60%	20%	16%	24%	k. D.	25%
Portale Hypertension	56%	68%	44%	15%	37%	46%

k. D.: keine Daten.

Im Gegensatz zu früheren Studien, die sich vor allem mit der Klinik und der Genetik der ARPKD beschäftigten, lag der Schwerpunkt unserer Arbeit in der immunhistochemischen Färbung von archivierten Nieren und Lebern, wodurch die niedrigere Patientenzahl zu erklären ist (Bergmann, C *et al.* 2005; Capisonda, R *et al.* 2003; Dias, NF *et al.* 2010; Guay-Woodford, LM and Desmond, RA 2003; Zerres, K *et al.* 1996). In Übereinstimmung mit früheren Studien be-

steht keine Assoziation der Erkrankung mit dem Geschlecht (Bergmann, C *et al.* 2005; Capisonda, R *et al.* 2003; Dias, NF *et al.* 2010; Guay-Woodford, LM and Desmond, RA 2003). Unsere Studie weist den höchsten Anteil an pränatalen Diagnosen auf, was sowohl auf die optimierten Ultraschallegeräte als auch auf die Möglichkeit der Durchführung einer DNA-Analyse zurückzuführen ist.

5.2 Histomorphologische Charakterisierung der erkrankten Nieren und Lebern

Morphologisch zeigten die Nieren das typische histologische Bild der ARPKD mit dilatierten radial angeordneten Sammelrohren bzw. distalen Tubuli, die an ein Spinnennetz erinnern, und sporadisch auftretenden Glomeruli (Dias, NF *et al.* 2010; Guay-Woodford, LM and Desmond, RA 2003). Die relative Parenchymfläche der Zystennieren entsprach im Mittel 39%. Nach Goilav handelt es sich bei einer relativen Parenchymfläche von mehr als 40% um ein Frühstadium, wohingegen das Endstadium mit weniger als 10% deklariert ist (Goilav, B *et al.* 2008). Dementsprechend waren in unserer Arbeit gemäß den morphologischen Veränderungen (noch) keine Niere im Endstadium und sieben sogar noch im Frühstadium der Erkrankung. Dennoch wies der Großteil der Patienten klinisch eine dialysepflichtige terminale Niereninsuffizienz auf.

Die Histomorphologie aller Lebern entspricht dem typischen Bild der ARPKD mit dilatierten Gallengängen, einer portalen Fibrose und gesunden, aber eingemauerten Hepatozyten. Auch diese Befunde sind mit den Ergebnissen von Guay-Woodford (Anteil der Cholangiodysplasien 95,5%) vergleichbar (Guay-Woodford, LM and Desmond, RA 2003). Demgegenüber beschrieb Dias nur in 46,1% aller Patienten eine Cholangiodysplasie und in 38,5% eine KHF (Dias, NF *et al.* 2010).

5.3 Immunhistochemische Analyse von Nieren und Lebern

In einer früheren Studie konnten wir bereits zeigen, dass in den *Nieren* der ARPKD-Patienten die *mTOR-Signalkaskade* aktiviert ist, wohingegen nur wenige Zellen Ki-67 positiv sind (Fischer, DC *et al.* 2009). Diese Ergebnisse haben wir an weiteren Nierenpräparaten bestätigt und sie deuten darauf hin, dass zumindest bei Patienten mit fortgeschrittener ARPKD das Zellwachstum und nicht die Zellteilung dominiert. In den gesunden Kontrollnieren waren Ki-67 und aktiviertes Akt nicht nachweisbar, wohingegen aktiviertes mTOR deutlich in den Sammelrohren und pS6K schwach im Zylinderepithel nachzuweisen waren. Zusammengenommen weisen unsere Ergebnisse und die kürzlich von Becker *et al.* publizierten Daten darauf hin, dass der mTOR-Signalweg in der ARPKD aktiviert ist (Becker, JU *et al.* 2010).

In den *Lebern* der ARPKD-Patienten war pmTOR im Gallengangsepithel nachweisbar, während pAkt und pS6K nur sporadisch in einzelnen Lebern vertreten waren. Da der verwendete mTOR-spezifische Antikörper gegen phosphoryliertes Ser2448 gerichtet ist, und diese Phosphorylierung auf die Akt-spezifische Aktivierung von mTOR zurückzuführen ist, wäre die Detektion von aktiviertem Akt zu erwarten gewesen. Da das nicht der Fall war, ist eine Wechselwirkung zwischen

mTORC1 und mTORC2 denkbar, die zur Hemmung von Akt führt. Der fehlende Nachweis von aktivierter S6K deutet darauf hin, dass die Signalweitergabe vom aktivierten mTOR auf S6K direkt oder indirekt durch einen bislang noch unbekannten Mediator unterbrochen wurde (Brunet, A *et al.* 1999; Peterson, RT *et al.* 1999). Nichtsdestotrotz spricht der Nachweis von aktiviertem mTOR dafür, dass mTOR - unabhängig von der PI3K-Signalkaskade - eine Rolle in der Genese der Gallengangshyperplasie spielt.

Ki-67-positive Zellen waren in 3 Lebern sporadisch im Gallengangsepithel nachzuweisen. Es bestand also weder in der Niere noch in der Leber ein Zusammenhang zwischen der mTOR-Aktivierung und der Proliferations-Aktivität. Das Auftreten von Ki-67-positiven Stromazellen in der Leber könnte die Folge von Cholangitiden mit Akkumulation von Entzündungszellen in den verbreiterten Portalfeldern sein. In der gesunden Leber ist weder in den Gallengängen noch in den Stromazellen oder in den Hepatozyten eine Aktivierung der mTOR-Signalkaskade nachweisbar, wohingegen vereinzelt Ki-67-positive Hepatozyten detektiert werden.

Eine unregulierte Aktivierung von mTOR konnte schon in anderen benignen und malignen Erkrankungen nachgewiesen werden (Hay, N and Sonenberg, N 2004; Lee, CH *et al.* 2007; Walz, G 2006; Wang, X and Proud, CG 2006; Wulschleger, S *et al.* 2006). Aktiviertes mTOR bedingt Proliferation und Zellwachstum, aber auch Zellwachstum unabhängig von Proliferation (Lee, CH *et al.* 2007). Die ARPKD beruht auf einer Mutation des Fibrocystins und Fischer *et al.* wiesen eine gegenüber gesunden Nieren deutlich erhöhte Expression von Fibrocystin in den erkrankten Nieren nach, lassen aber die Bedeutung dieses Befundes offen (Fischer, DC *et al.* 2009).

Shillingford *et al.* schrieben Polycystin 1 (PC-1), dem Zystoprotein der ADPKD, die primäre Rolle in der Zystogenese der ADPKD zu, da in Madin Darby Canine Kidney-Tubulusepithelzellen (MDCK-Zellen) eine Interaktion von Polycystin 1 mit Tuberin bzw. TSC2 nachgewiesen werden konnte. Zusammen mit dem Nachweis einer erhöhten mTOR-Expression in den Nieren von ADPKD-Patienten und der Tatsache, dass Tuberin mTOR hemmt, ergab sich die Hypothese, dass ein mutiertes Polycystin 1 infolge einer gestörten Interaktion mit TSC zur Aktivierung von mTOR und damit polyzystischen Nieren führt (Shillingford, JM *et al.* 2006; Weimbs, T 2006). Diese Hypothese wurde zudem durch tierexperimentelle Studien gestützt. So führte die Hemmung von mTOR durch Rapamycin zu einer Verlangsamung, wenn auch nicht Stagnation, des progressiven Zystenwachstums in männlichen Han:SPRD Ratten, einem Tiermodell der ADPKD. Parallel dazu verlangsamte sich auch der Progress der Niereninsuffizienz (Tao, Y *et al.* 2005b; Wahl, PR *et al.* 2006). Shillingford beschrieb in Rapamycin-therapierten *opk*-Mäusen neben der reduzierten Zystenexpansion eine Hemmung der Proliferation und eine selektive Induktion der Apoptose (Shillingford, JM *et al.* 2006).

Da sowohl PC-1 als auch FPC in den primären Zilien lokalisiert sind und es zudem zur Interaktion beider Proteine untereinander und mit anderen Zystoproteinen kommt, ist die Zilienfunktion vermutlich bereits durch Mutation eines der beteiligten Proteine gestört. Diese Zilienhypothese

wird einerseits durch die frappierenden klinischen Ähnlichkeiten der polyzystischen Nierenerkrankungen gestützt und hat andererseits dazu geführt, dass ähnliche therapeutische Konzepte für ADPKD und ARPKD evaluiert werden. Hier sind sowohl die Versuche, mTOR durch Rapamycin zu hemmen, als auch die Hinweise auf eine mTOR-unabhängige kausale Beteiligung von S6K zu nennen (Lee, CH *et al.* 2007; Wahl, PR *et al.* 2006; Walz, G 2006).

Leider hat sich inzwischen aber gezeigt, dass die Hemmung von mTOR mit Rapamycin nicht geeignet ist, die Progression der Erkrankung zu hemmen. So sind die positiven Ergebnisse der männlichen Han:SPRD-Ratten nicht auf die weiblichen Tiere übertragbar (Belibi, F *et al.* 2011). Eine andere Studie an PCK-Ratten, einem orthologen Tiermodell der ARPKD, zeigte, dass die Behandlung mit Rapamycin nicht die erhofften positiven Effekte hat und sich im Gegenteil die Behandlung negativ auf die Tiere auswirkte (Renken, C *et al.* 2011). Auch die initial positiven Ergebnisse klinischer Studien an ADPKD-Patienten bestätigten sich nicht. Der Einsatz von Everolimus bzw. Rapamycin zeigte keine positiven Effekte auf die progrediente Niereninsuffizienz und die Patienten litten unter nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen (Serra, AL *et al.* 2010; Walz, G *et al.* 2010).

Aus der Zilienhypothese ergeben sich neben mTOR noch weitere Wachstumsfaktoren und Mediatoren, die als Angriffspunkt therapeutischer Interventionen untersucht werden. Von besonderer Bedeutung scheinen dabei cAMP und der Epidermal growth factor (EGF) zu sein. Allerdings wurden nach deren Hemmung entweder positive Effekte in Leber oder Niere beschrieben, nicht jedoch in beiden Organen gleichzeitig (Gattone, VH, 2nd *et al.* 2003; Sato, Y *et al.* 2006; Sweeney, WE, Jr. and Avner, ED 2006; Torres, VE *et al.* 2004). Desweiteren könnten auch ein verminderter Calcium-Einstrom, ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System und erhöhtes PPAR- γ an der Pathogenese beteiligt sein (Wen, J 2011).

Bis jetzt wurden *Apoptosemarker* immunhistochemisch nur in erkranktem Nierengewebe nachgewiesen, nicht jedoch in Lebern von ARPKD-Patienten. Zur Analyse der Apoptose in Nieren und Lebern wählten wir Marker des extrazellulären Signalweges (aktivierte Initiatorcaspase-8), der frühen (Annexin V) und fortgeschrittenen Apoptose (aktivierte Effektorcaspase-3 und fragmentierter DNA) sowie Bcl-2 als antiapoptotischen Faktor. Der Nachweis apoptotischer Zellen wird dadurch erschwert, dass diese innerhalb weniger Stunden von benachbarten Zellen und/oder durch Makrophagen phagozytiert werden und damit nicht mehr nachweisbar sind (Fadok, VA *et al.* 1992; Savill, J *et al.* 1990).

Wir konnten Annexin V, Caspase-8 und Bcl-2 immunhistochemisch in den Epithelien von Nieren und Lebern nachweisen. Da aktivierte Caspase-8 in den Zysten- und Gallengangsepithelien zu detektieren war, kann man vermuten, dass die Apoptose in Nieren und Lebern durch den extrinsischen Signalweg initiiert wird. Goilav und Tao demonstrieren ebenfalls eine erhöhte Expression von Caspase-8 in den Nieren von ARPKD- bzw. ADPKD-Patienten und Han:SPRD

Ratten (Goilav, B *et al.* 2008; Tao, Y *et al.* 2005c). Allerdings beschreibt Goilav Caspase-8-positive Zellen nur im Endstadium der Erkrankung und dann ohne Prävalenz zu einer Zystengröße (Goilav, B *et al.* 2008). In den Tiermodellen von Tao wird zudem ein FasL-unabhängiger extrazellulärer Signalweg beschrieben (Tao, Y *et al.* 2005c).

Annexin V als Marker der frühen Apoptose ist deutlich in den Epithelien vertreten, aber weder fragmentierte DNA noch Caspase-3 als Marker der späten Apoptose sind vermehrt nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die spät-apoptotischen Zellen bereits abgeräumt wurden und folglich nicht mehr im Gewebe präsent sind. Andererseits könnte es aber auch zu einem Abbruch der Apoptose-Reaktion gekommen sein.

Auffällig ist, dass fragmentierte DNA vermehrt im Interstitium der Nieren und Lebern nachweisbar ist. Dies wurde auch in cpk-Mäusen, einem Tiermodell der ARPKD, beschrieben (Ali, SM *et al.* 2000). Im Interstitium könnten die Apoptosen zu dessen Zerstörung führen und damit den Zystenepithelien bzw. den Gallengängen die Expansion ermöglichen (Wilson, PD 2004). Darüber hinaus weisen die Apoptosen in den kleinen Zysten bzw. nicht-zystischen Tubuli darauf hin, dass die progressive Niereninsuffizienz durch die Zerstörung des normalen Nierengewebes entsteht (Woo, D 1995).

Bcl-2 war sowohl in den Nieren als auch Lebern deutlich in den Epithelien nachweisbar. Da Bcl-2 die Aktivierung von Procaspase-3 und damit die Apoptose hemmt, bleiben Bcl-2-positive Zellen eher erhalten (Korsmeyer, SJ 1999; Liu, X *et al.* 1996; Zhivotovsky, B *et al.* 1998). Diese Hypothese steht im Einklang mit tierexperimentellen Studien. So entwickeln sich in Bcl-2 Knockout-Mäusen Nierenzysten (Veis, DJ *et al.* 1993). In den Lebern ließen sich Bcl-2-positive Zellen auch im Interstitium nachweisen. Möglicherweise handelt es sich hier um die Folgen einer Cholangitis.

Mit Ausnahme von fragmentierter DNA finden sich die Apoptosemarker gehäuft innerhalb einzelner Epithelabschnitte und weniger in singulären Zellen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Tierstudien an Han:SPRD Ratten und Studien an Nieren von ADPKD- bzw. ARPKD-Patienten überein (Goilav, B *et al.* 2008; Tao, Y *et al.* 2005c). Die Beteiligung eines ganzen Tubulusabschnittes bzw. Gallenganges lässt vermuten, dass die Apoptose durch parakrine Signaltransduktionen initiiert wird. In den gesunden Nieren ließen sich in Übereinstimmung mit publizierten Daten wenig Apoptosen im Tubulussystem bzw. den Sammelrohren nachweisen (Goilav, B *et al.* 2008; Woo, D 1995). Die gesunde Leber zeigt in den Gallengängen keine Apoptosen.

Zusammengefasst weisen die oben beschriebenen Befunde darauf hin, dass Apoptosen in Nieren und Lebern von ARPKD-Patienten häufig vorkommen und damit nicht alleine die Proliferation für die Zystenbildung verantwortlich ist (Nadasdy, T *et al.* 1995; Woo, D 1995). Gesteigerte Apoptosen sind ein charakteristisches Merkmal der polyzystischen Nierenerkrankungen (Ali, SM *et al.* 2000; Woo, D 1995; Zhou, XJ and Kukes, G 1998). Auch in Tiermodellen, in denen Bcl-2 ausgeschaltet wurde, wurden gehäuft Apoptosen und Proliferation mit Zystenexpansion

nachgewiesen (Kamada, S *et al.* 1995; Nakayama, K *et al.* 1994; Sorenson, CM *et al.* 1995; Veis, DJ *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von Bcl-2 zu verminderter Zystogenese (Lin, HH *et al.* 1999). Dies verdeutlicht, wie wichtig Apoptosen in der Pathogenese polyzystischer Nierenerkrankungen sind.

Ursachen der vermehrten Apoptosen könnten primär eine Dysregulation oder aber sekundär eine Gegenreaktion auf die Proliferation sein. Goilav schrieb der Apoptose in der ARPKD hingegen keine primäre Rolle in der Pathogenese zu, da sie in seiner Studie vermehrt in Nieren im Endstadium, d.h. bei einer relativen Parenchymfläche von weniger als 10%, auftraten (Goilav, B *et al.* 2008). Bei kritischer Betrachtung dieser Behauptung muss berücksichtigt werden, dass in der Studie nur 4 Nieren im Endstadium und 1 Niere im Frühstadium (Spontanabort in der 19. SSW) untersucht bzw. verglichen wurden, was die Aussagekraft deutlich mindert.

Neben der Hemmung der Proliferation, könnte auch eine therapeutische Hemmung der Apoptose die Expansion von Zysten und Gallengängen in der ARPKD beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist die Therapie mit Pancaspase-Inhibitoren zu nennen (Michalke M, SA, Burek M *et al.* 2000). An männlichen Han:SPRD-Ratten führte der Pancaspase Inhibitor IDN-8050 zu reduzierten Apoptosen und hemmte die Proliferationen sowie die progrediente Nierenvergrößerung. Darüber hinaus nahm die Zahl der Zysten ab und die Nierenfunktion verbesserte sich (Tao, Y *et al.* 2005a). Im Gegensatz dazu scheinen spezifische Caspase-Inhibitoren zur vermehrten Expression anderer Caspasen zu führen, wodurch die Zystenformation zwar verlangsamt, jedoch nicht aufgehalten wird (Tao, Y *et al.* 2008). Bei dem Einsatz von Caspase-Inhibitoren muss aber berücksichtigt werden, dass die Apoptose auch ein wichtiger physiologischer Vorgang ist, um beispielsweise Zellen mit ausgedehnten DNA-Schäden zu eliminieren. Wenn dieses nur noch eingeschränkt möglich ist, erhöht sich das Risiko neoplastischer Transformationen (Torres, VE 1999).

Die gleichzeitigen Abnahmen der Apoptose und Proliferation durch Caspase-Hemmung lässt vermuten, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Apoptose, Proliferation und Zystenbildung besteht - so wie beispielsweise über c-myc in der ADPKD (Lanoix, J *et al.* 1996). So entwickeln SBM-Mäusen, die c-myc überexprimieren, eine PKD mit erhöhten Apoptosen und Proliferationen (Trudel, M *et al.* 1998; Trudel, M *et al.* 1991). Auch zeigen Bcl-2-defiziente Mäuse postnatal gesteigerte Apoptosen in den Nieren, die zusammen mit der Hyperproliferation des Epithels zu einer schweren PKD führen (Kamada, S *et al.* 1995; Nakayama, K *et al.* 1994; Sorenson, CM *et al.* 1995; Veis, DJ *et al.* 1993).

Die Proliferation und Apoptose in der ARPKD könnten über mTOR reguliert werden, denn neben der Steuerung der Proteinsynthese hat mTOR auch Funktionen in der Regulation der Apoptose. Diese Funktionen werden sowohl durch den Zelltyp, den Zellzyklus und proapoptotische

Zielproteine wie p53, Bad und Bcl-2 beeinflusst (Castedo, M *et al.* 2002). So wurde gezeigt, dass mTOR die Apoptose über Phosphorylierung von Bcl-2 einleiten kann (Asnaghi, L *et al.* 2004). Auch das „Prolin-reiche Akt-Substrat“ (PRAS40), welches an mTORC1 bindet und bei Mangel die Apoptose verhindert, sowie PRR5-Like (PRR5-L), welches an mTORC2 bindet und die Apoptose einleitet, unterstreichen die zentrale Rolle von mTOR für Proliferation und Apoptose (Thedieck, K *et al.* 2007). Zusätzlich kann p70S6K das proapoptotischen Protein Bad inaktivieren, indem es die Phosphorylierung an Ser136 hemmt (Harada, H *et al.* 2001).

Entgegen der geläufigen Meinung, dass Proliferation und Apoptose gleichermaßen zur Zystogenese in der ARPKD führen, schreiben andere Studien der Apoptose die primäre Rolle in der Pathogenese zu. So führte die Hemmung von Fibrocystin in Sammelrohrzellen der inneren Medulla *in vitro* zu vermehrten Apoptosen, verringerten Proliferationen und einer gestörten Tubulomorphogenese (Mai, W *et al.* 2005). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie, die an Mäusen mit einer Mutation in PKHD1 durchgeführt wurde. In diesen Mäusen führte die verminderte Aktivität von Fibrocystin zur Hemmung des Ras/MAMP-Signalweges, was eine verminderte Proliferation und vermehrte Apoptosen über eine Aktivitätsminderung von Akt und nachfolgender Aktivierung des Bax/Caspase-9, Caspase-3-Signalweges bewirkte (Hu, B *et al.*). Dies würde allerdings bedeuten, dass in den Nieren von ARPKD-Patienten Caspase-3 und Caspase-9 vermehrt aktiviert sind, was mit unseren und den Ergebnissen von Goilav nicht übereinstimmt (Goilav, B *et al.* 2008). Allerdings hat weder unsere noch die Studie von Goilav diesbezüglich eine hohe Aussagekraft, da wie oben beschrieben die apoptotischen Zellen schon abgeräumt sein könnten und somit nicht mehr nachweisbar sind.

Eine Schwachstelle unserer Arbeit ist die immunhistochemische Färbung, die nur eine Momentaufnahme eines kleinen Ausschnittes des Gewebes darstellt. Alle Präparate wurden unter identischen Bedingungen (Verdünnung der Erst- und Zweitantikörper) angefärbt, jedoch könnten Unterschiede der Präparateeinbettung zu abweichenden Färbeergebnissen führen. So fiel beispielsweise auf, dass sich das Präparat aus Prag deutlich anders als die aus Hamburg oder Hannover schneiden ließ. Zum Nachweis von Bcl-2, Caspase-3 und Caspase-8 wurden je zwei Antikörper verwendet, da es bei diesen zu unvorhersehbaren Qualitätsproblemen kam. Eine weitere Fehlerquelle stellt die subjektive Auswertung der Präparate und die notwendige Datenreduktion, d.h. die Kategorisierung der Färbeergebnisse in Scores, dar.

5.4 Ausblick

Diese Studie hat gezeigt, dass aktiviertes mTOR sowohl in den Zystenepithelien der Nieren als auch in den Gallengangsepithelien der Leber von ARPKD-Patienten nachweisbar und damit möglicherweise für die Progression dieser Erkrankung relevant ist. Allerdings unterschieden sich die Lebern und Nieren im Hinblick auf den Nachweis von aktiviertem Akt und S6K. Dies deutet

darauf hin, dass in den unterschiedlichen Zelltypen (Sammelrohrzellen und Gallengangsepithel) unterschiedliche Signalwege zur Aktivierung von mTOR führen. Die Apoptosen treten in der Niere vor allem in den kleinen und mittelgroßen Zysten auf, wohingegen mTOR in allen Zysten-
größen aktiviert ist. Dies würde die Vermutung unterstützen, dass die Zysten über Proliferation expandieren und nicht-zystische Tubulusabschnitte bzw. kleine Zysten über Apoptose zugrunde gehen. In der Leber ließen sich sowohl die Apoptosen als auch das aktivierte mTOR in den Gallengangsepithelien nachweisen. Es könnte also sein, dass das aktivierte mTOR in der Niere und Leber über unterschiedliche Mechanismen aktiviert wird und auch unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert. Zur Überprüfung dieser Hypothesen sind weitere Untersuchungen an geeigneten Zellkulturen und Tiermodellen notwendig.

6. Zusammenfassung

Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) ist durch beidseitige polyzystischen Nieren und eine kongenitale hepatische Fibrose (KHF) gekennzeichnet. Die Erkrankung zählt zu den Ziliopathien, da alle ursächlichen Mutationen das *PKHD1* (Polycystic kidney and hepatic disease 1)-Gen und damit das in den Zilien exprimierte Fibrocystin / Polyductin (FPC) betreffen. Die ARPKD ist mit einer Inzidenz von 1:20.000 Lebendgeburten eine wesentliche Ursache der Neugeborenen- und Säuglingssterblichkeit. Die Krankheit betrifft sowohl die Nieren als auch Lebern, neben einer progredienten Niereninsuffizienz mit Zystenbildung liegt eine Malformation der Duktalplatte mit den langfristigen Folgen einer portalen Hypertension vor.

Der Phänotyp der Erkrankung spricht für eine gestörte Balance von Proliferation und Apoptose. Daher wurden von Patienten mit klinisch und/oder genetisch gesicherter ARPKD archiviertes Nieren- bzw. Lebergewebe sowohl morphologisch als auch immunhistochemisch untersucht. Zur morphologischen Begutachtung wurden die Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Präparate mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Für die Immunhistochemie nutzten wir die Avidin-Biotin-Complex-Technik (ABC-Methode) und die TUNEL-Methode. Im Einzelnen wurden der mTOR-Signalweg (pAkt, pmTOR und pS6K), die Zellproliferation (Ki-67) und verschiedene Marker apoptotischer Zellen analysiert - diese umfassten den extrazellulären Signalweg (aktivierte Initiatorcaspase-8), die frühe (Annexin V) und späte Apoptose (aktivierte Effektorcaspase-3 und fragmentierte DNA) sowie Bcl-2 als antiapoptotischen Faktor. Es wurden die aktivierten Isoformen der jeweiligen Kinase nachgewiesen.

Die erkrankten Nieren (n=16) haben im Vergleich zu zwei gesunden Kontrollen eine bezogen auf die Gewebefläche stark reduzierte relative Parenchymfläche (39% vs. 95,40%). pAkt, pmTOR und pS6K sind im Zystenepithel der Nieren der ARPKD-Patienten stark exprimiert, wobei die gesunden Kontrollen lediglich eine Aktivität von pmTOR in den Sammelrohren aufweisen. In der Leber zeigt sich in den dilatierten Gallengängen ebenfalls eine deutliche Expression von pmTOR, wohingegen sich pAkt und pS6K nur vereinzelt darstellen lassen. In der gesunden Leber ist keine Aktivierung des mTOR-Signalweges nachweisbar. Ki-67 ist sowohl in der Niere als auch in der Leber sporadisch in einzelnen Zellen nachweisbar, also unabhängig von der Expression von pmTOR. In den erkrankten Nieren sind Annexin V, Bcl-2 und Caspase-8 deutlich in den Zystenepithelien nachweisbar. Fragmentierte DNA findet sich hingegen nur sporadisch im Zystenepithel und Stroma. Die Färbungen von Caspase-3 zeigen meist ein negatives Ergebnis. Annexin V und Caspase-8 sind bevorzugt in kleinen und mittelgroßen Zysten, Bcl-2 in mittelgroßen Zysten und fragmentierte DNA in großen Zysten anfärbbar. Der Bcl-2-Score zeigte eine Assoziation mit der relativen Parenchymfläche. In der gesunden Niere lassen sich Annexin V sowie Bcl-2 in den Sammelrohren und Caspase-8 in den distalen Tubuli nachweisen, während

Caspase-3 nicht nachweisbar ist. Fragmentierte DNA kommt in den gesunden Nieren sporadisch sowohl in den Sammelrohren als auch in den distalen Tubuli vor.

In den erkrankten Lebern können Annexin V, Caspase-8 und Bcl-2 in den Gallengängen nachgewiesen werden. Zusätzlich finden sich in den Stromazellen sowohl Bcl-2 als auch fragmentierte DNA. In der gesunden Leber lassen sich Annexin V und fragmentierte DNA vereinzelt in den Hepatozyten nachweisen.

Diese Studie hat gezeigt, dass aktiviertes mTOR sowohl in den Zystenepithelien der Nieren als auch in den Gallengangsepithelien der Leber von ARPKD-Patienten nachweisbar und damit möglicherweise für die Progression dieser Erkrankung relevant ist. Allerdings unterschieden sich die Lebern und Nieren im Hinblick auf den Nachweis von aktiviertem Akt und S6K. Dies deutet darauf hin, dass in den unterschiedlichen Zelltypen (Sammelrohrzellen und Gallengangsepithel) unterschiedliche Signalwege zur Aktivierung von mTOR führen. Die Apoptosen treten in der Niere vor allem in den kleinen und mittelgroßen Zysten auf, wohingegen mTOR in allen Zysten-Größen aktiviert ist. Dies würde die Vermutung unterstützen, dass die Zysten über Proliferation expandieren und nicht-zystische Tubulusabschnitte bzw. kleine Zysten über Apoptose zugrunde gehen. In der Leber ließen sich sowohl die Apoptosen als auch das aktivierte mTOR in den Gallengangsepithelien nachweisen. Es könnte also sein, dass das aktivierte mTOR in der Niere und Leber über unterschiedliche Mechanismen aktiviert wird und auch unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert. Zur Überprüfung dieser Hypothesen sind weitere Untersuchungen an geeigneten Zellkulturen und Tiermodellen notwendig.

7. Thesen

1. Bei 10 von 16 ARPKD-Patienten wurde die Diagnose pränatal bzw. bei der Geburt gestellt. Dies war die im Vergleich zu früheren Arbeiten höchste Rate und ist sowohl auf die optimierten Ultraschallgeräte als auch auf die Möglichkeit der Durchführung einer DNA-Analyse zurückzuführen.
2. Im Median beträgt die auf die Gewebefläche bezogene relative Parenchymfläche der ARPKD-Nieren 39% (25,9% - 62,3%), während sie in den zwei gesunden Kontrollen 95,4% (95,0% und 95,8%) beträgt. Orientierend an der relativen Parenchymfläche befindet sich keine Niere im Endstadium und sieben Nieren im Frühstadium der Erkrankung.
3. Da pmTOR sowohl in den Nieren als auch Lebern der ARPKD-Patienten deutlich in den Zystenepithelien und Gallengängen nachweisbar ist, ist davon auszugehen, dass mTOR eine aktive Rolle in der Pathogenese der ARPKD spielt.
4. Nur in den Nieren der ARPKD-Patienten ist der Akt-mTOR-Signalweg aktiviert, was auf eine Beteiligung des PI3K-Signalweges hindeutet.
5. Der alleinige Nachweis von pmTOR in den Lebern ohne Aktivierung von Akt bzw. S6K deutet darauf hin, das mTOR unabhängig von der PI3K-Signalkaskade eine Rolle in der Genese der Gallengangshyperplasie spielen könnte.
6. mTOR wird in der Niere und Leber über unterschiedliche Mechanismen aktiviert und beeinflusst unterschiedliche intrazelluläre Signalwege.
7. Ki-67 ist sowohl in der Niere als auch in der Leber sporadisch in einzelnen Zellen nachzuweisen, was darauf hindeutet, dass Zellwachstum und nicht Zellteilung dominiert.
8. Die Aktivierung der Caspase-8 im Zystenepithel (Median=32) und Gallengangsepithel (Median=25) spricht für die Beteiligung des extrinsischen Signalweges.
9. Caspase-3 und fragmentierte DNA als Marker der fortgeschrittenen Apoptose sind in Lebern und Nieren schwach bis gar nicht nachweisbar, wohingegen der antiapoptotische Faktor Bcl-2 deutlich in den Epithelien aktiviert ist. Dies spricht dafür, dass die Apoptose durch die vermehrte Expression von Bcl-2 gestoppt bzw. verhindert wird.

10. Die DNA-Fragmentation kann in einzelnen Zellen im Zystenepithel nachgewiesen werden, wobei größtenteils die großen Zysten betroffen sind. Zusätzlich findet sich fragmentierte DNA in Interstitium der Nieren. In der Leber ist mit einer Ausnahme keine fragmentierte DNA in den Gallengangsepithelien nachweisbar, wohingegen sie im Stroma und in den Hepatozyten detektiert wurde.

11. Mit Ausnahme von fragmentierter DNA finden sich die Apoptosemarker gehäuft innerhalb einzelner Epithelabschnitte und weniger in singulären Zellen. Die Beteiligung eines ganzen Tubulusabschnittes bzw. Gallenganges lässt vermuten, dass die Apoptose durch parakrinen Signaltransduktionen initiiert wird.

8. Literaturverzeichnis

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X and Akey CW (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* **9**(2): 423-32.
- Adams JM and Cory S (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* **281**(5381): 1322-6.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." *EMBO J* **15**(23): 6541-51.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB and Cohen P (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α ." *Curr Biol* **7**(4): 261-9.
- Ali SM, Wong VY, Kikly K, Fredrickson TA, Keller PM, DeWolf WE, Jr., Lee D and Brooks DP (2000). "Apoptosis in polycystic kidney disease: involvement of caspases." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**(3): R763-9.
- Alvarez B, Garrido E, Garcia-Sanz JA and Carrera AC (2003). "Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate." *J Biol Chem* **278**(29): 26466-73.
- Anichini A, Mortarini R, Sensi M and Zanon M (2006). "APAF-1 signaling in human melanoma." *Cancer Lett* **238**(2): 168-79.
- Ashkenazi A and Dixit VM (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.
- Asnaghi L, Bruno P, Priulla M and Nicolin A (2004). "mTOR: a protein kinase switching between life and death." *Pharmacol Res* **50**(6): 545-9.
- Atkins MB, Yasothan U and Kirkpatrick P (2009). "Everolimus." *Nat Rev Drug Discov* **8**(7): 535-6.
- Bachelder RE, Ribick MJ, Marchetti A, Falcioni R, Soddu S, Davis KR and Mercurio AM (1999). "p53 inhibits $\alpha 6 \beta 4$ integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB." *J Cell Biol* **147**(5): 1063-72.
- Bean SA, Bednarek FJ and Primack WA (1995). "Aggressive respiratory support and unilateral nephrectomy for infants with severe perinatal autosomal recessive polycystic kidney disease." *J Pediatr* **127**(2): 311-3.
- Becker JU, Opazo Saez A, Zerres K, Witzke O, Hoyer PF, Schmid KW, Kribben A, Bergmann C and Nurnberger J (2010). "The mTOR pathway is activated in human autosomal-recessive polycystic kidney disease." *Kidney Blood Press Res* **33**(2): 129-38.
- Belibi F, Ravichandran K, Zafar I, He Z and Edelstein CL (2011). "mTORC1/2 and rapamycin in female Han:SPRD rats with polycystic kidney disease." *Am J Physiol Renal Physiol* **300**(1): F236-44.
- Bergmann C, Senderek J, Windelen E, Kupper F, Middeldorf I, Schneider F, Dornia C, Rudnik-Schoneborn S, Konrad M, Schmitt CP, Seeman T, Neuhaus TJ, Vester U, Kirfel J, Buttner R and Zerres K (2005). "Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD)." *Kidney Int* **67**(3): 829-48.
- Bergmann C and Zerres K (2008). Polycystic kidney disease: ADPKD and ARPKD. *Comprehensive Pediatric Nephrology*. Geary DF and Schaefer F. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier: 155-178.
- Blyth H and Ockenden BG (1971). "Polycystic disease of kidney and liver presenting in childhood." *J Med Genet* **8**(3): 257-84.
- Boatright KM, Ratus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR and Salvesen GS (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* **11**(2): 529-41.
- Bonventre JV and Weinberg JM (2003). "Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure." *J Am Soc Nephrol* **14**(8): 2199-210.
- Bosniak MA and Ambos MA (1975). "Polycystic kidney disease." *Semin Roentgenol* **10**(2): 133-43.

- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J and Greenberg ME (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.
- Burgering BM and Coffey PJ (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." *Nature* **376**(6541): 599-602.
- Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH and Sabatini DM (1998). "RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1432-7.
- Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM and Cohen GM (2000). "Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes." *J Biol Chem* **275**(9): 6067-70.
- Cain RJ and Ridley AJ (2009). "Phosphoinositide 3-kinases in cell migration." *Biol Cell* **101**(1): 13-29.
- Capisonda R, Phan V, Traubci J, Daneman A, Balfe JW and Guay-Woodford LM (2003). "Autosomal recessive polycystic kidney disease: outcomes from a single-center experience." *Pediatr Nephrol* **18**(2): 119-26.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S and Reed JC (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* **282**(5392): 1318-21.
- Castedo M, Ferri KF and Kroemer G (2002). "Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic." *Cell Death Differ* **9**(2): 99-100.
- Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA and McCubrey JA (2003). "Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy." *Leukemia* **17**(3): 590-603.
- Chapal M, Debout A, Dufay A, Salomon R, Roussey G, Burtsey S, Launay EA, Vigneau C, Blancho G, Loirat C, Hourmant M and Fakhouri F (2012). "Kidney and liver transplantation in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease: a multicentric study." *Nephrol Dial Transplant* **27**(5): 2083-8.
- Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR and Blenis J (1992). "Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases." *Cell* **69**(7): 1227-36.
- Danial NN and Korsmeyer SJ (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-19.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* **91**(2): 231-41.
- Degterev A, Boyce M and Yuan J (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-67.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R and Nunez G (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." *Science* **278**(5338): 687-9.
- Dell KM (2011). "The spectrum of polycystic kidney disease in children." *Adv Chronic Kidney Dis* **18**(5): 339-47.
- Denamur E, Delezoide AL, Alberti C, Bourillon A, Gubler MC, Bouvier R, Pascaud O, Elion J, Grandchamp B, Michel-Calemard L, Missy P, Zaccaria I, Le Nagard H, Gerard B, Loirat C, Barbet J, Beaufre AM, Berchel C, Bessieres B, Boudjemaa S, Buenerd A, Carles D, Clemenson A, Dechelotte P, Devisme L, Dijoud F, Esperandieu O, Fallet C, Gonzales M, Hillion Y, Jacob B, Joubert M, Kermanach P, Lallemand A, Laquerriere A, Laurent N, Liprandi A, Loeuillet L, Loget P, Martinovic J, Menez F, Narcy F, Roux JJ, Rouleau-Dubois C, Sinico M, Tantau J and Wann AR (2009). "Genotype-phenotype correlations in fetuses and neonates with autosomal recessive polycystic kidney disease." *Kidney Int* **77**(4): 350-8.
- Dennis PB, Pullen N, Pearson RB, Kozma SC and Thomas G (1998). "Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation." *J Biol Chem* **273**(24): 14845-52.
- Desmet VJ (1992). "Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "ductal plate malformation". " *Hepatology* **16**(4): 1069-83.
- Dias NF, Lanzarini V, Onuchic LF and Koch VH (2010). "Clinical aspects of autosomal recessive polycystic kidney disease." *J Bras Nefrol* **32**(3): 263-7.

- Dibble CC, Asara JM and Manning BD (2009). "Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1." *Mol Cell Biol* **29**(21): 5657-70.
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C and Grutter MG (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." *Mol Cell* **11**(2): 543-9.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA and Henson PM (1992). "Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells." *J Immunol* **149**(12): 4029-35.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E and Blenis J (2002). "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E." *Genes Dev* **16**(12): 1472-87.
- Fischer DC, Jacoby U, Pape L, Ward CJ, Kuwertz-Broeking E, Renken C, Nizze H, Querfeld U, Rudolph B, Mueller-Wiefel DE, Bergmann C and Haffner D (2009). "Activation of the AKT/mTOR pathway in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)." *Nephrol Dial Transplant* **24**(6): 1819-27.
- Follit JA, Li L, Vucica Y and Pazour GJ (2010). "The cytoplasmic tail of fibrocystin contains a ciliary targeting sequence." *J Cell Biol* **188**(1): 21-8.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC and Toker A (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." *Science* **275**(5300): 665-8.
- Fruman DA, Meyers RE and Cantley LC (1998). "Phosphoinositide kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507.
- Gascue C, Katsanis N and Badano JL (2011). "Cystic diseases of the kidney: ciliary dysfunction and cystogenic mechanisms." *Pediatr Nephrol* **26**(8): 1181-95.
- Gattone VH, 2nd, Wang X, Harris PC and Torres VE (2003). "Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist." *Nat Med* **9**(10): 1323-6.
- Gingras AC, Raught B and Sonenberg N (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes Dev* **15**(7): 807-26.
- Goilav B, Satlin LM and Wilson PD (2008). "Pathways of apoptosis in human autosomal recessive and autosomal dominant polycystic kidney diseases." *Pediatr Nephrol* **23**(9): 1473-82.
- Green DR and Kroemer G (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." *Science* **305**(5684): 626-9.
- Gruss HJ and Dower SK (1995). "Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas." *Blood* **85**(12): 3378-404.
- Guay-Woodford L (1996). Autosomal recessive disease: clinical and genetic profiles. Polycystic kidney disease. Watson M and Torres VE. Oxford, Oxford University Press: 237-267.
- Guay-Woodford LM (2006). "Renal cystic diseases: diverse phenotypes converge on the cilium/centrosome complex." *Pediatr Nephrol* **21**(10): 1369-76.
- Guay-Woodford LM and Desmond RA (2003). "Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America." *Pediatrics* **111**(5 Pt 1): 1072-80.
- Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD, Avner ED, Germino GG, Guillot AP, Herrin J, Holleman R, Irons DA, Primack W and et al. (1995). "The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling." *Am J Hum Genet* **56**(5): 1101-7.
- Gunay-Aygun M (2009). "Liver and kidney disease in ciliopathies." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **151C**(4): 296-306.
- Gunay-Aygun M, Font-Montgomery E, Lukose L, Gerstein MT, Piwnicka-Worms K, Choyke P, Daryanani KT, Turkbey B, Fischer R, Bernardini I, Sincan M, Zhao X, Sandler NG, Roque A, Douek DC, Graf J, Huizing M, Bryant JC, Mohan P, Gahl WA and Heller T (2013). "Characteristics of Congenital Hepatic Fibrosis in a Large Cohort of Patients with Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease." *Gastroenterology*.

- Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N and Korsmeyer SJ (2001). "p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9666-70.
- Harris PC and Torres VE (2009). "Polycystic kidney disease." *Annu Rev Med* **60**: 321-37.
- Hay N and Sonenberg N (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* **18**(16): 1926-45.
- Hiesberger T, Gourley E, Erickson A, Koulen P, Ward CJ, Masyuk TV, Larusso NF, Harris PC and Igarashi P (2006). "Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C." *J Biol Chem* **281**(45): 34357-64.
- Hildebrandt F and Otto E (2005). "Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease?" *Nat Rev Genet* **6**(12): 928-40.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL and Korsmeyer SJ (1993). "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis." *Cell* **75**(2): 241-51.
- Hu B, He X, Li A, Qiu Q, Li C, Liang D, Zhao P, Ma J, Coffey RJ, Zhan Q and Wu G (2010). "Cystogenesis in ARPKD results from increased apoptosis in collecting duct epithelial cells of Pkhd1 mutant kidneys." *Exp Cell Res* **317**(2): 173-87.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J and Guan KL (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol* **4**(9): 648-57.
- Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC and Raff MC (1993). "Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA." *Nature* **361**(6410): 365-9.
- Jacobson MD, Weil M and Raff MC (1997). "Programmed cell death in animal development." *Cell* **88**(3): 347-54.
- Jain M, LeQuesne GW, Bourne AJ and Henning P (1997). "High-resolution ultrasonography in the differential diagnosis of cystic diseases of the kidney in infancy and childhood: preliminary experience." *J Ultrasound Med* **16**(4): 235-40.
- Jin Z and El-Deiry WS (2005). "Overview of cell death signaling pathways." *Cancer Biol Ther* **4**(2): 139-63.
- Jorgensen MJ (1977). "The ductal plate malformation." *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*(257): 1-87.
- Kaariainen H (1987). "Polycystic kidney disease in children: a genetic and epidemiological study of 82 Finnish patients." *J Med Genet* **24**(8): 474-81.
- Kamada S, Shimono A, Shinto Y, Tsujimura T, Takahashi T, Noda T, Kitamura Y, Kondoh H and Tsujimoto Y (1995). "bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine." *Cancer Res* **55**(2): 354-9.
- Kaplan BS, Fay J, Shah V, Dillon MJ and Barratt TM (1989). "Autosomal recessive polycystic kidney disease." *Pediatr Nephrol* **3**(1): 43-9.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* **53**(17): 3976-85.
- Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT and Bredesen DE (1996). "Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5): 2234-8.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kim J, Cha JH, Tisher CC and Madsen KM (1996). "Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney." *Am J Physiol* **270**(4 Pt 2): F575-92.
- Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D and Williams LT (1997). "A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain." *Mol Cell Biol* **17**(1): 338-44.
- Kolb RJ and Nauli SM (2008). "Ciliary dysfunction in polycystic kidney disease: an emerging model with polarizing potential." *Front Biosci* **13**: 4451-66.
- Korsmeyer SJ (1999). "BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death." *Cancer Res* **59**(7 Suppl): 1693s-1700s.

- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ and Schlesinger PH (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-73.
- Kuure S, Vuolteenaho R and Vainio S (2000). "Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation." *Mech Dev* **92**(1): 31-45.
- Landing BH, Wells TR and Claireaux AE (1980). "Morphometric analysis of liver lesions in cystic diseases of childhood." *Hum Pathol* **11**(5 Suppl): 549-60.
- Lanoix J, D'Agati V, Szabolcs M and Trudel M (1996). "Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)." *Oncogene* **13**(6): 1153-60.
- Lee CH, Inoki K and Guan KL (2007). "mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 443-67.
- Lee S, Comer FI, Sasaki A, McLeod IX, Duong Y, Okumura K, Yates JR, 3rd, Parent CA and Firtel RA (2005). "TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in Dictyostelium." *Mol Biol Cell* **16**(10): 4572-83.
- Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Lin HH, Yang TP, Jiang ST, Yang HY and Tang MJ (1999). "Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced Madin-Darby canine kidney simple epithelial cyst formation." *Kidney Int* **55**(1): 168-78.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* **86**(1): 147-57.
- Liu X, Zou H, Slaughter C and Wang X (1997). "DFP, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." *Cell* **89**(2): 175-84.
- Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T and Sotelo-Avila C (2005). "Expression of components of the renin-angiotensin system in autosomal recessive polycystic kidney disease." *J Histochem Cytochem* **53**(8): 979-88.
- Lonergan GJ, Rice RR and Suarez ES (2000). "Autosomal recessive polycystic kidney disease: radiologic-pathologic correlation." *Radiographics* **20**(3): 837-55.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Mai W, Chen D, Ding T, Kim I, Park S, Cho SY, Chu JS, Liang D, Wang N, Wu D, Li S, Zhao P, Zent R and Wu G (2005). "Inhibition of Pkhd1 impairs tubulomorphogenesis of cultured IMCD cells." *Mol Biol Cell* **16**(9): 4398-409.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J and Cantley LC (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." *Mol Cell* **10**(1): 151-62.
- Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC and Green DR (1995). "Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis." *J Biol Chem* **270**(12): 6425-8.
- Matsuda O, Ideura T, Shinoda T, Shiigai T, Takeuchi H, Chen WC and Miyake S (1990). "Polycystic kidney of autosomal dominant inheritance, polycystic liver and congenital hepatic fibrosis in a single kindred." *Am J Nephrol* **10**(3): 237-41.
- Meier P, Finch A and Evan G (2000). "Apoptosis in development." *Nature* **407**(6805): 796-801.
- Michalke M SA, Burek M et al. (2000). *Caspases as Targets for Drug Development*. [Internet] MCB D. Austin (TX), Landes Bioscience.
- Moser BA, Dennis PB, Pullen N, Pearson RB, Williamson NA, Wettenhall RE, Kozma SC and Thomas G (1997). "Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k." *Mol Cell Biol* **17**(9): 5648-55.
- Nadasdy T, Laszik Z, Lajoie G, Blick KE, Wheeler DE and Silva FG (1995). "Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases." *J Am Soc Nephrol* **5**(7): 1462-8.
- Nagano J, Kitamura K, Hujer KM, Ward CJ, Bram RJ, Hopfer U, Tomita K, Huang C and Miller RT (2005). "Fibrocystin interacts with CAML, a protein involved in Ca²⁺ signaling." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 880-9.
- Nagata S (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-65.

- Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H and Loh DY (1994). "Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3700-4.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE and Zhou J (2003). "Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells." *Nat Genet* **33**(2): 129-37.
- Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR and Shepherd PR (1999). "Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation." *Biochem J* **344 Pt 2**: 427-31.
- Neamati N, Fernandez A, Wright S, Kiefer J and McConkey DJ (1995). "Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei." *J Immunol* **154**(8): 3788-95.
- Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z, Bergmann C, Senderek J, Esquivel E, Zeltner R, Rudnik-Schoneborn S, Mrug M, Sweeney W, Avner ED, Zerres K, Guay-Woodford LM, Somlo S and Germino GG (2002). "PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats." *Am J Hum Genet* **70**(5): 1305-17.
- Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T and Hildebrandt F (2003). "Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination." *Nat Genet* **34**(4): 413-20.
- Pardee AB (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." *Science* **246**(4930): 603-8.
- Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL and Witman GB (2002). "Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease." *Curr Biol* **12**(11): R378-80.
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguie F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C and Bouscary D (2002). "Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma." *Oncogene* **21**(43): 6587-97.
- Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS and Schreiber SL (1999). "Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4438-42.
- Pijnenborg JM, Romano A, Dam-de Veen GC, Dunselman GA, Fischer DC, Groothuis PG and Kieback DG (2005). "Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma." *J Pathol* **205**(5): 597-605.
- Polymenis M and Schmidt EV (1999). "Coordination of cell growth with cell division." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 76-80.
- Potter EL (1965). "BILATERAL ABSENCE OF URETERS AND KIDNEYS: A REPORT OF 50 CASES." *Obstet Gynecol* **25**: 3-12.
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA and Thomas G (1998). "Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1." *Science* **279**(5351): 707-10.
- Pullen N and Thomas G (1997). "The modular phosphorylation and activation of p70s6k." *FEBS Lett* **410**(1): 78-82.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC and Salvesen GS (2001). "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14250-5.
- Renken C, Fischer DC, Kundt G, Gretz N and Haffner D (2011). "Inhibition of mTOR with sirolimus does not attenuate progression of liver and kidney disease in PCK rats." *Nephrol Dial Transplant* **26**(1): 92-100.
- Ribas J, Gomez-Arbones X and Boix J (2005). "Caspase 8/10 are not mediating apoptosis in neuroblastoma cells treated with CDK inhibitory drugs." *Eur J Pharmacol* **524**(1-3): 49-52.

- Rodriguez J and Lazebnik Y (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." *Genes Dev* **13**(24): 3179-84.
- Rokudai S, Fujita N, Hashimoto Y and Tsuruo T (2000). "Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis." *J Cell Physiol* **182**(2): 290-6.
- Roy S, Dillon MJ, Trompeter RS and Barratt TM (1997). "Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term outcome of neonatal survivors." *Pediatr Nephrol* **11**(3): 302-6.
- Sakahira H, Enari M and Nagata S (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." *Nature* **391**(6662): 96-9.
- Saltiel AR and Kahn CR (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Sarbassov DD, Ali SM and Sabatini DM (2005a). "Growing roles for the mTOR pathway." *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 596-603.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM and Sabatini DM (2005b). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-101.
- Sato Y, Harada K, Furubo S, Kizawa K, Sanzen T, Yasoshima M, Ozaki S, Isse K, Sasaki M and Nakanuma Y (2006). "Inhibition of intrahepatic bile duct dilation of the polycystic kidney rat with a novel tyrosine kinase inhibitor gefitinib." *Am J Pathol* **169**(4): 1238-50.
- Saucedo LJ and Edgar BA (2002). "Why size matters: altering cell size." *Curr Opin Genet Dev* **12**(5): 565-71.
- Savill J, Dransfield I, Hogg N and Haslett C (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis." *Nature* **343**(6254): 170-3.
- Savill J and Fadok V (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." *Nature* **407**(6805): 784-8.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J* **17**(6): 1675-87.
- Schlegel RA and Williamson P (2001). "Phosphatidylserine, a death knell." *Cell Death Differ* **8**(6): 551-63.
- Schmidt A, Kunz J and Hall MN (1996). "TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13780-5.
- Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM and Abraham RT (2000). "A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells." *Cancer Res* **60**(13): 3504-13.
- Serra AL, Poster D, Kistler AD, Krauer F, Raina S, Young J, Rentsch KM, Spanaus KS, Senn O, Kristanto P, Scheffel H, Weishaupt D and Wuthrich RP (2010). "Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease." *N Engl J Med* **363**(9): 820-9.
- Shi Y (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* **9**(3): 459-70.
- Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek KB, Germino GG and Weimbs T (2006). "The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5466-71.
- Smith CA, Farrah T and Goodwin RG (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." *Cell* **76**(6): 959-62.
- Sorenson CM (1998). "Life, death and kidneys: regulation of renal programmed cell death." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**(1): 5-12.
- Sorenson CM, Rogers SA, Korsmeyer SJ and Hammerman MR (1995). "Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2-deficient mice." *Am J Physiol* **268**(1 Pt 2): F73-81.
- Srinath A and Shneider BL (2012). "Congenital hepatic fibrosis and autosomal recessive polycystic kidney disease." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **54**(5): 580-7.
- Stennicke HR and Salvesen GS (1998). "Properties of the caspases." *Biochim Biophys Acta* **1387**(1-2): 17-31.
- Stolovich M, Tang H, Hornstein E, Levy G, Cohen R, Bae SS, Birnbaum MJ and Meyuhas O (2002). "Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP

- mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation." *Mol Cell Biol* **22**(23): 8101-13.
- Summerfield JA, Nagafuchi Y, Sherlock S, Cadafalch J and Scheuer PJ (1986). "Hepatobiliary fibropolycystic diseases. A clinical and histological review of 51 patients." *J Hepatol* **2**(2): 141-56.
- Sweeney WE, Jr. and Avner ED (2006). "Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)." *Cell Tissue Res* **326**(3): 671-85.
- Tao Y, Kim J, Faubel S, Wu JC, Falk SA, Schrier RW and Edelstein CL (2005a). "Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(19): 6954-9.
- Tao Y, Kim J, Schrier RW and Edelstein CL (2005b). "Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* **16**(1): 46-51.
- Tao Y, Kim J, Stanley M, He Z, Faubel S, Schrier RW and Edelstein CL (2005c). "Pathways of caspase-mediated apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD)." *Kidney Int* **67**(3): 909-19.
- Tao Y, Zafar I, Kim J, Schrier RW and Edelstein CL (2008). "Caspase-3 gene deletion prolongs survival in polycystic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* **19**(4): 749-55.
- Tapon N, Moberg KH and Hariharan IK (2001). "The coupling of cell growth to the cell cycle." *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 731-7.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH and Goeddel DV (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." *Cell* **74**(5): 845-53.
- Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arriemerlou C and Hall MN (2007). "PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis." *PLoS One* **2**(11): e1217.
- Thompson CB (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* **267**(5203): 1456-62.
- Torres VE (1999). "Apoptosis in cystogenesis: hands on or hands off?" *Kidney Int* **55**(1): 334-5.
- Torres VE, Sweeney WE, Jr., Wang X, Qian Q, Harris PC, Frost P and Avner ED (2004). "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition is not protective in PCK rats." *Kidney Int* **66**(5): 1766-73.
- Trudel M, Barisoni L, Lanoix J and D'Agati V (1998). "Polycystic kidney disease in SBM transgenic mice: role of c-myc in disease induction and progression." *Am J Pathol* **152**(1): 219-29.
- Trudel M, D'Agati V and Costantini F (1991). "C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice." *Kidney Int* **39**(4): 665-71.
- Turkbey B, Ocak I, Daryanani K, Font-Montgomery E, Lukose L, Bryant J, Tuchman M, Mohan P, Heller T, Gahl WA, Choyke PL and Gunay-Aygun M (2009). "Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis (ARPKD/CHF)." *Pediatr Radiol* **39**(2): 100-11.
- Vanhaesebroeck B and Waterfield MD (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." *Exp Cell Res* **253**(1): 239-54.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P and Wallach D (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." *Immunity* **9**(2): 267-76.
- Vaux DL, Haecker G and Strasser A (1994). "An evolutionary perspective on apoptosis." *Cell* **76**(5): 777-9.
- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR and Korsmeyer SJ (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." *Cell* **75**(2): 229-40.
- Vogelstein B and Kinzler KW (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med* **10**(8): 789-99.
- Wahl PR, Serra AL, Le Hir M, Molle KD, Hall MN and Wuthrich RP (2006). "Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)." *Nephrol Dial Transplant* **21**(3): 598-604.

- Walz G (2006). "Therapeutic approaches in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): is there light at the end of the tunnel?" *Nephrol Dial Transplant* **21**(7): 1752-7.
- Walz G, Budde K, Mannaa M, Nurnberger J, Wanner C, Sommerer C, Kunzendorf U, Banas B, Horl WH, Obermuller N, Arns W, Pavenstadt H, Gaedeke J, Buchert M, May C, Gschaidmeier H, Kramer S and Eckardt KU (2010). "Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease." *N Engl J Med* **363**(9): 830-40.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR and Proud CG (2001). "Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase." *EMBO J* **20**(16): 4370-9.
- Wang X and Proud CG (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." *Physiology (Bethesda)* **21**: 362-9.
- Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE and Harris PC (2002). "The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein." *Nat Genet* **30**(3): 259-69.
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashtithi R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE and Harris PC (2003). "Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia." *Hum Mol Genet* **12**(20): 2703-10.
- Watnick T and Germino G (2003). "From cilia to cyst." *Nat Genet* **34**(4): 355-6.
- Weimbs T (2006). "Regulation of mTOR by polycystin-1: is polycystic kidney disease a case of futile repair?" *Cell Cycle* **5**(21): 2425-9.
- Wen J (2011). "Congenital hepatic fibrosis in autosomal recessive polycystic kidney disease." *Clin Transl Sci* **4**(6): 460-5.
- Wilson PD (2004). "Polycystic kidney disease." *N Engl J Med* **350**(2): 151-64.
- Witzleben CL and Sharp AR (1982). "'Nephronophthisis-congenital hepatic fibrosis': an additional hepatorenal disorder." *Hum Pathol* **13**(8): 728-33.
- Wolf BB and Green DR (1999). "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases." *J Biol Chem* **274**(29): 20049-52.
- Woo D (1995). "Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases." *N Engl J Med* **333**(1): 18-25.
- Wullschlegel S, Loewith R and Hall MN (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* **124**(3): 471-84.
- Yoder BK, Hou X and Guay-Woodford LM (2002). "The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia." *J Am Soc Nephrol* **13**(10): 2508-16.
- Zaragoza D, Ghavidel A, Heitman J and Schultz MC (1998). "Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway." *Mol Cell Biol* **18**(8): 4463-70.
- Zaytseva YY, Valentino JD, Gulhati P and Evers BM (2012). "mTOR inhibitors in cancer therapy." *Cancer Lett* **319**(1): 1-7.
- Zerres K, Mucher G, Bachner L, Deschenes G, Eggermann T, Kaariainen H, Knapp M, Lennert T, Misselwitz J, von Muhlendahl KE and et al. (1994). "Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen." *Nat Genet* **7**(3): 429-32.
- Zerres K, Mucher G, Becker J, Steinkamm C, Rudnik-Schoneborn S, Heikkila P, Rapola J, Salonen R, Germino GG, Onuchic L, Somlo S, Avner ED, Harman LA, Stockwin JM and Guay-Woodford LM (1998a). "Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology." *Am J Med Genet* **76**(2): 137-44.
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Deget F, Holtkamp U, Brodehl J, Geisert J and Scharer K (1996). "Autosomal recessive polycystic kidney disease in 115 children: clinical presentation, course and influence of gender. Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische, Nephrologie." *Acta Paediatr* **85**(4): 437-45.
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Steinkamm C, Becker J and Mucher G (1998b). "Autosomal recessive polycystic kidney disease." *J Mol Med (Berl)* **76**(5): 303-9.

- Zerres K, Volpel MC and Weiss H (1984). "Cystic kidneys. Genetics, pathologic anatomy, clinical picture, and prenatal diagnosis." *Hum Genet* **68**(2): 104-35.
- Zhang Q, Taulman PD and Yoder BK (2004). "Cystic kidney diseases: all roads lead to the cilium." *Physiology (Bethesda)* **19**: 225-30.
- Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT and Doskeland SO (1998). "Injected cytochrome c induces apoptosis." *Nature* **391**(6666): 449-50.
- Zhou XJ and Kukes G (1998). "Pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: role of apoptosis." *Diagn Mol Pathol* **7**(2): 65-8.
- Zimmermann KC, Bonzon C and Green DR (2001). "The machinery of programmed cell death." *Pharmacol Ther* **92**(1): 57-70.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR and Thompson CB (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." *Genes Dev* **15**(12): 1481-6.

IV Anhang

Anhang 1 Individuelle klinische Daten und genetische Befunde der Patienten

ID	HRO2	H3	H4	MS5	H6	H7	B9	HH10	H11	H12	H13	HH14	HH16	Pr17	HRO19	HH20
Geschlecht	w	m	m	m	m	m	w	w	w	m	w	m	m	w	m	w
Alter bei																
Diagnose	prä-natal	prä-natal	Geburt	prä-natal	14 d	Geburt	6 d	prä-natal	3 d	Geburt	6.0 a	k.D.	prä-natal	peri-natal	post-natal	prä-natal
Dialyse	2,75 a	1,0 a	6,0 a	5,0 a	--	0,92 a	4,0 a	3 d	--	0,25 a	13,92 a	k.D.	8,0 a	2,17 a	2,25 a	6,25 a
NE	2,75 a	2,75 a	9,17 a	6,67 a	3,08 a	1,46 a	4,17 a	11 d	0,58 a	0,25 a	15,0 a	k.D.	10,08 a	2,17 a	2,25 a	6,25 a
LTX	--	--	9,17 a	--	--	5,46 a	--	1,75 a	--	--	15,0 a	10,08 a	10,08 a	--	--	6,25 a
Körperhöhe																
NE [cm]	90	78	119	109	88	72	95	50	62	55	154		130	77	90	103
NE [SDS]	-0,97	-1,09	-2,78	-2,42	-2,33	-3,36	-2,16	-0,97	-2,49	-2,94	-1,66	k.D.	-1,70	-3,19	-0,15	-3,07
LTX [cm]			119			88		72			154	128,7	130			103
LTX [SDS]	--	--	-2,78	--	--	-5,10	--	-3,74	--	--	-1,66	-1,90	-1,70	--	--	-3,07

ID Geschlecht	HRO2 w	H3 m	H4 m	MS5 m	H6 m	H7 m	B9 w	HH10 w	H11 w	H12 m	H13 w	HH14 m	HH16 m	Pr17 w	HRO19 m	HH20 w
Serum-Kreatinin [μmol/l] vor NE	630	352	468	k.D.	830	469	186	105.6	k.D.	k.D.	604	k.D.	512.6	200	478	309
Portale Hyper- tension	nein	nein	ja*	nein	nein	ja*	ja	ja	nein	nein	ja*	ja*	ja	nein	ja	ja
direkter Umkehr des Qpva	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein
Caroli-Syndrom	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	k.D.	nein	nein	nein	nein
Cholangio- dysplasie	wahrsch.	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein*	nein	nein	ja	nein	nein	ja*	ja*
Mutation	T36M; V2884 del	L1996 fs	Y1838C; Y1838C	I1998T; Q3407X	Y1136C	k.D.	T36M	T36M; G3080E	k.D.	P1773L	C1692F	k.D.	k.D.	indirekt	C9370T	indirekt

Die klinischen Daten wurden retrospektiv erfasst. Alle Angaben zu den extrarenalen Manifestationen beziehen sich auf den Zeitpunkt der ersten Nephrektomie (HRO2, MS5, HH10) bzw. der Lebertransplantation (HH14). Eine kontralaterale Nephrektomie wurde im Abstand von 6 Monaten (HH10), 12 Monaten (MS5) und 16 Monaten (HRO2) durchgeführt. Beim Patienten H11 erfolgte eine beidseitige Nephrektomie bei Nierentransplantation. Bei den Patienten H4, H13, HH16 und HH20 wurden Nephrektomie, Nieren- und Lebertransplantation in einer Sitzung realisiert. Bei den Patienten H6 und H11 erfolgte eine präemptive Nierentransplantation. NE: Nephrektomie, LTX: Lebertransplantation, Qpva: portalvenöser Blutfluss, k.D: keine Daten, indirekt: indirekte DNA-Analyse, * histologisch gesicherte Leberfibrose

Anhang 2 Individuelle Befunde der Nierenpräparate

Nachweis von						
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2
HRO2	I	2	k.M.	k.M.	0	2
	N _{Zy}	1			0	1
	N _Z /N _{Zy}	3			0	3
	S _{Niere}	6			0	6
	ZG	m			-	m, g
	I _{St} / A _{St}				2 / 1	
	I	1	k.M.	2	0	3
	N _{Zy}	1		2	0	1
	N _Z /N _{Zy}	4		3	0	4
	S _{Niere}	4		12	0	12
	ZG	k		alle	-	m
	I _{St} / A _{St}				3 / 1	
H3	I	k.M.	3	0	1	3
	N _{Zy}		1	0	2	1
	N _Z /N _{Zy}		3	0	1	3
	S _{Niere}		9	0	2	9
	ZG		m	-	g	m
	I _{St} / A _{St}				3 / 1	
H4	I	3	3	2	2	3
	N _{Zy}	2	1 (1 Zyste)	1	1	2
	N _Z /N _{Zy}	3	4	3	2	4
	S _{Niere}	18	12	6	4	24
	ZG	k, m	k	m	m, g	k, m
	I _{St} / A _{St}				2 / 1	

Nachweis von						
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2
MS5	I	1	4	0	0	4
	N _{Zy}	1	1	0	0	2
	N _Z /N _{Zy}	4	4	0	0	4
	S_{Niere}	4	16	0	0	32
	ZG	m	k, m	-	-	m
	I _{St} / A _{St}				0	
	I	2	4	1	0	1
	N _{Zy}	3	2	1	0	1
	N _Z /N _{Zy}	4	3	4	0	2
	S_{Niere}	24	24	4	0	2
	ZG	m	k, m	m	-	m
	I _{St} / A _{St}				2 / 1	
H6	I	3	4	0	1	3
	N _{Zy}	3	1	0	1	1
	N _Z /N _{Zy}	4	3	0	3	2
	S_{Niere}	36	12	0	3	6
	ZG	m	k	-	m	m
	I _{St} / A _{St}				3 / 1	
B9	I	2	4	0	3	3
	N _{Zy}	1	1	0	1	2
	N _Z /N _{Zy}	4	4	0	1	4
	S_{Niere}	8	16	0	3	24
	ZG	m	k, m	-	g	k, m
	I _{St} / A _{St}				4 / 1 (1 Zelle)	
HH10	I	2	3	0	3	3
	N _{Zy}	1	2	0	1	1
	N _Z /N _{Zy}	3	3	0	1	3
	S_{Niere}	6	18	0	3	9
	ZG	m	alle	-	g	m
	I _{St} / A _{St}				3/1	

Nachweis von						
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2
H11	I	2	0	0	2	3
	N _{Zy}	4	0	0	1	1
	N _Z /N _{Zy}	4	0	0	1	4
	S _{Niere}	32	0	0	2	12
	ZG	m, g	-	-	m	m
	I _{St} / A _{St}				2 / 1	
H12	I	0	2	0	2	0
	N _{Zy}	0	1	0	1	0
	N _Z /N _{Zy}	0	3	0	1	0
	S _{Niere}	0	6	0	2	0
	ZG	-	k, m	-	g	-
	I _{St} / A _{St}				0	
H13	I	3	3	1	3	3
	N _{Zy}	1	2	1	1	2
	N _Z /N _{Zy}	4	4	3	1	4
	S _{Niere}	12	24	3	3	24
	ZG	m	alle	m	g	m
	I _{St} / A _{St}				0	
HH16	I	4	3	0	0	3
	N _{Zy}	3	2	0	0	1
	N _Z /N _{Zy}	3	2	0	0	3
	S _{Niere}	36	12	0	0	9
	ZG	m, g	alle	-	-	m
	I _{St} / A _{St}				0	
Pr17	I	3	k.M.	2	1	3
	N _{Zy}	1		1	1	1
	N _Z /N _{Zy}	4		4	2	4
	S _{Niere}	12		8	2	12
	ZG	k, m		m	g	m
	I _{St} / A _{St}				3 / 1	

Nachweis von						
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2
HRO19	I	4	4	0	3	4
	N _{Zy}	3	3	0	1	4
	N _Z /N _{Zy}	4	4	0	1	4
	S _{Niere}	48	48	0	3	64
	ZG	m, g	alle	-	m, g	alle
	I _{St} / A _{St}				3(4) / 1	
HH20	I	4	4	1	0	3
	N _{Zy}	3	2	1	0	4
	N _Z /N _{Zy}	4	1	4	0	4
	S _{Niere}	48	8	4	0	48
	ZG	m, g	alle	k, m	-	alle
	I _{St} / A _{St}				0	
gesunde Niere	I	1	3	0	2	2
	N _{Zy}	1	1	0	1	2
	N _Z /N _{Zy}	4	3	0	1	4
	S _{Niere}	4	9	0	2	16
	ZG	dT	S	-	dT, S	S
	I _{St} / A _{St}				0	

I: Färbeintensität der Zystenepithelien (0 = negativ, 1 = schwache Braunfärbung, 2 = deutliche Braunfärbung, 3 = intensive Braunfärbung, 4 = dunkelbraune/schwarze Färbung), N_{Zy}: gemittelter relativer Anteil positiver Zysten (0 = negativ, 1 = ≤ 5%, 2 = >5 und ≤ 50%, 3 = > 50% und < 75%, 4 = ≥ 75%), N_Z/N_{Zy}: gemittelter relativer Anteil positiver Zellen in den Zysten (Klassifikation siehe N_{Zy}), S_{Niere}: Score der Nierenpräparate (S_{Niere} = I * N_{Zy} * N_Z/N_{Zy}), ZG: Zellgröße (k: kleine Zysten (4-9 Epithelzellen), m: mittelgroße Zysten (10-100 Epithelzellen), g: große Zysten (>100 Epithelzellen), Sammelrohr, dT: distaler Tubulus), I_{St}: Färbeintensität der Stromazellen (Klassifikation siehe I), A_{St}: Anordnung der Stromazellen (1 = einzelt, 2 = kumuliert), S:

Anhang 3 Individuelle Befunde der Leberpräparate

		Nachweis von								
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2	pAkt	mTOR	p70S6	Ki-67
H4	I	2	2	0	0	2				
	N _{GG}	3	4	0	0	4				
	N _Z /N _{GG}	3	4	0	0	4				
	S_{Leber}	18	32	0	0	32	(+)	++	-	+
	I _{St} / A _{ST}	0	0	0	2 / 1	0	0	0	0	4 / 1
	I _{HZ} / N _{HZ}	0	0	0	0	0	0	0	0	2 / 1
H7	I	0	1	0	0	1				
	N _{GG}	0	4	0	0	3				
	N _Z /N _{GG}	0	4	0	0	4				
	S_{Leber}	0	16	0	0	12	-	+++	+	-
	I _{St} / A _{ST}	4 / 3	0	4 / 1	2 / 1	2 / 2	0	0	3 / 2	0
	I _{HZ} / N _{HZ}	0	0	4 / 1	2 / 1	0	0	2 / 2	2 / 2	0
HH10	I	4	4	0	0	0				
	N _{GG}	2	2	0	0	0				
	N _Z /N _{GG}	4	4	0	0	0				
	S_{Leber}	32	32	0	0	0	-	+	-	-
	I _{St} / A _{ST}	0	0	0	2 / 1	2 / 1	0	0	0	4 / 1
	I _{HZ} / N _{HZ}	0	0	0	2 / 2	0	0	0	0	4 / 1

Nachweis von										
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2	pAkt	mTOR	p70S6	Ki-67
H11	I		2	0	3	1				
	N _{GG}		4	0	2	4				
	N _Z /N _{GG}		3	0	1	4				
	S _{Leber}	k.M.	24	0	6	16	-	+	-	(+)
	I _{St} / A _{ST}		3 / 1	2 / 1	3 / 2	1 / 2	0	0	0	4 / 1
	I _{HZ} / N _{HZ}		0	0	2 / 1	0	0	0	0	0
HH14	I	1	4	0	0	3				
	N _{GG}	3	4	0	0	1				
	N _Z /N _{GG}	3	3	0	0	1				
	S _{Leber}	9	48	0	0	3	(+)	+++	-	-
	I _{St} / A _{ST}	3 / 1	0	0	2 / 1	1 / 1	0	0	2 / 1	0
	I _{HZ} / N _{HZ}	1 / 3	0	0	2 / 1	0	0	0	3 / 3	0
HH16	I	0	4	0	0	2				
	N _{GG}	0	4	0	0	2				
	N _Z /N _{GG}	0	3	0	0	3				
	S _{Leber}	0	48	0	0	12	-	+++	-	(+)
	I _{St} / A _{ST}	0	0	0	3 / 1	3 / 1	0	0	0	3 / 1
	I _{HZ} / N _{HZ}	0	0	0	2 / 1	0	0	0	1 / 3	0

		Nachweis von								
		Caspase-8	Annexin V	Caspase-3	fragm. DNA	Bcl-2	pAkt	mTOR	p70S6	Ki-67
HH20	I	2	4	0	0	1				
	N _{GG}	4	2	0	0	2				
	N _Z /N _{GG}	4	4	0	0	4				
	S _{Leber}	32	48	0	0	8	+	++(+)	-	-
	I _{St} / A _{ST}	3 / 1	0	-	3 / 1	0	1 / 1	0	0	4 / 1
	I _{HZ} / N _{HZ}	1 / 3	0	0	3 / 1 (1 Zelle)	2 / 4	0	0	0	0
gesunde Leber	I	0	0	0	0	0				
	N _{GG}	0	0	0	0	0				
	N _Z /N _{GG}	0	0	0	0	0				
	S _{Leber}	0	0	0	0	0	-	-	-	-
	I _{St} / A _{ST}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I _{HZ} / N _{HZ}	0	3 / 2	0	3 / 4	0	0	0	0	2 / 1

I: Färbeintensität der Gallengangsepithelien (0 = negativ, 1 = schwache Braunfärbung, 2 = deutliche Braunfärbung, 3 = intensive Braunfärbung, 4 = dunkelbraune/schwarze Färbung), N_{GG}: gemittelter relativer Anteil positiver Gallengänge (0 = negativ, 1 = ≤ 5%, 2 = >5 und ≤ 50%, 3 = > 50% und < 75%, 4 = ≥ 75%), N_Z/N_{GG}: gemittelter relativer Anteil positiver Zellen in den Gallengängen (Klassifikation siehe N_{GG}), S_{Leber}: Score der Leberpräparate (S_{Leber} = I * N_{GG} * N_Z/N_{GG}), I_{St}: Färbeintensität der Stromazellen Klassifikation siehe I), A_{St}: Anordnung der Stromazellen (1 = vereinzelt, 2 = kumuliert), I_{HZ}: Färbeintensität der Hepatozyten (Klassifikation siehe I), N_{HZ}: gemittelter relativer Anteil positiver Hepatozyten, bezogen auf die Zahl der Hepatozyten im gesamten Präparat (Klassifikation siehe N_{GG})